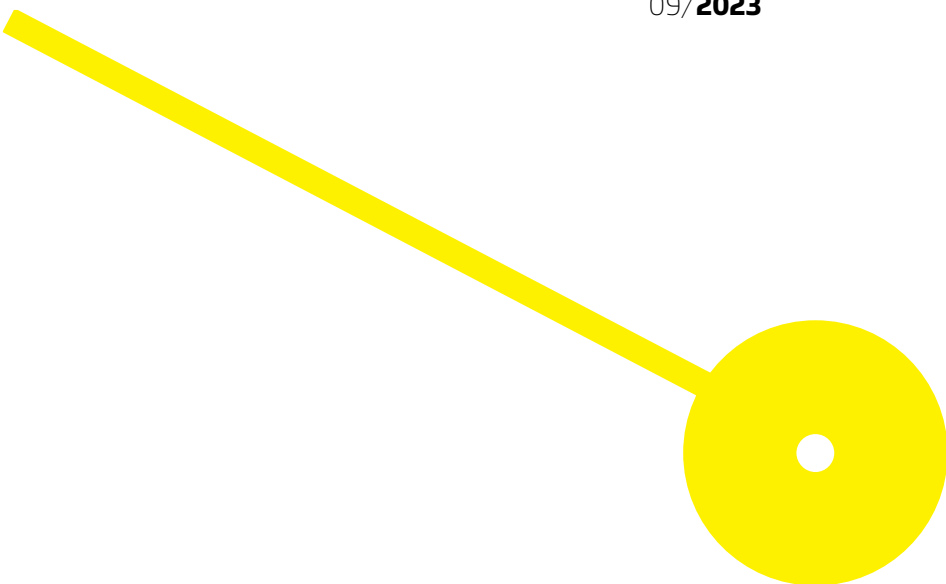




Avaliação da resposta imunitária a baixas doses de radiação ionizante em peixe zebra

Ricardo Dinis Azevedo Martins

09/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Avaliação da resposta imunitária a baixas doses de radiação ionizante em peixe zebra

Autor

Ricardo Dinis Azevedo Martins

Orientador(es)

Prof. Dr. Pedro Costa, ATC-Medicina Nuclear & CISA da ESS|P.Porto

Prof. Dr. Ricardo Ferraz, ATC-CQB da ESS|P.Porto e LAQV-REQUIMTE da FCUP

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo em **Bioquímica Clínica e Metabólica** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Primeiro, gostava de agradecer ao Professor Pedro, que me orientou e me deu toda a que eu necessitava, mesmo quando situações externas dificultavam o contacto.

Ao Miguel, por me ter ajudado quando o professor não pode estar presente, e sem essa ajuda, a todo o estudo não teria corrido tão bem como correu.

Finalmente, mas não em último, um agradecimento especial aos meus pais, irmãos e todos os meus amigos, que me deram o apoio necessário para ultrapassar este ano atribulado e terminar esta fase da minha vida numa nota positiva!

Resumo

O sistema imune é um dos principais alvos da radiação ionizante. Os efeitos de altas doses de radiação são conhecidos e bem documentados, mas os de baixas doses (LDIR) carecem de estudos aprofundados. O peixe zebra tem sistema imune bem preservado, sendo um modelo atraente para estudar LDIR.

Neste contexto, realizou-se uma revisão bibliográfica para criar um esboço inicial da interação LDIR-sistema imune.

Em termos experimentais, avaliou-se os efeitos da irradiação com doses de 10 e 35 mGy em peixe zebra, estudando-se o impacto do tempo decorrido pós irradiação na expressão de proteína C-reativa (CRP) e IFN-gama, utilizando ELISA.

Na análise teórica, verificou-se que LDIR em irradiações agudas induz resposta pró-inflamatória e LDIR em irradiações crônicas resposta anti-inflamatória.

Após irradiação, CRP apresentou aumentos significativos no grupo de 35 mGy, do 1º ao 7º dia, enquanto 10 mGy teve aumento e decréscimo ligeiros ao 1º e 7º dia, respetivamente. Quanto a IFN-gama, verificaram-se ligeiros decréscimos no 1º dia, nas duas doses, mas uma redução significativa para 10 mGy ao 7º dia.

Os resultados sugerem que irradiações com dose absorvida de 10 e 35 mGy, com baixa taxa de dose, provocam inflamação inicial, proporcional à dose, e induzem respostas anti-inflamatórias para combatê-la.

Palavras-chave: radiobiologia; radiação ionizante; baixa dose; sistema imune; peixe zebra

Abstract

The immune system is a major target of ionizing radiation. While the effects of high radiation doses are well-known, those of low doses (LDIR) remain unclear. Zebrafish possess a well-preserved immune system, making them an appealing model to study LDIR effects.

A literature review was made to understand the relationship between LDIR and the immune system. It was concluded that acute LDIR induces a pro-inflammatory response, while chronic LDIR elicits an anti-inflammatory response.

Subsequently, zebrafish were exposed to radiation doses of 10 and 35 mGy, and the expression of C-reactive protein (CRP) and IFN-gamma was quantified at the first- and seventh-day post-irradiation using ELISA tests.

Following irradiation, CRP exhibited significant increases with 35 mGy from day 1 to day 7, whereas 10 mGy showed a minor increase on day 1 and a slight decline on day 7. As for IFN-gamma, there were modest reductions on day 1 for both doses, but a significant reduction for 10 mGy on day 7.

The results suggest that low-dose irradiation at 10 and 35 mGy triggers initial dose-proportional inflammatory responses, followed by anti-inflammatory responses to counteract inflammation.

Keywords: radiobiology; ionizing radiation; low dose; Immune system; zebrafish

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Radiação.....	1
1.1.1.	Radiobiologia.....	2
1.1.2.	Baixas doses vs Altas doses de Radiação ionizante.....	5
1.2.	Sistema Imune.....	6
1.3.	Peixe zebra.....	9
1.3.1.	Sistema imune e peixe zebra.....	11
1.4.	Objetivos.....	12
2.	Artigo de revisão.....	13
2.1.	Metodologia de pesquisa.....	13
2.2.	Síntese dos resultados.....	14
2.3.	Conclusão do artigo.....	15
2.4.	Apresentação e publicação do artigo.....	16
3.	Material e métodos.....	17
3.1.	Origem dos peixes zebra.....	17
3.2.	Manutenção dos peixes zebra.....	17
3.3.	Manutenção do viveiro de artémia.....	18
3.4.	Irradiação dos peixes.....	18
3.5.	Sacrifício e preparação das amostras de material biológico.....	20
3.6.	Análise dos parâmetros.....	21
3.6.1.	Análise da expressão de CRP por ELISA.....	21
3.6.2.	Análise da expressão de IFN-gama por ELISA.....	21
3.7.	Análise estatística.....	21
3.8.	Aspetos éticos.....	22
4.	Resultados.....	23
4.1.	Manutenção e irradiação dos peixes.....	23
4.2.	Sacrifícios.....	23
4.3.	Análise da expressão de CRP.....	23
4.4.	Análise da expressão de IFN-gama.....	25
5.	Discussão.....	27

6.	Conclusão.....	32
7.	Referências Bibliográficas.....	34
8.	Anexos	38

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

BCR: do inglês *B cell receptor*

CD28: Cluster de diferenciação 28

CD4: Cluster de diferenciação 4

CD8: Cluster de diferenciação 8

CRISPR/Cas9: do inglês *Clustered regularly interspaced palindromic repeats/caspase 9*

CRP: do inglês *C-reactive protein*

ELISA: do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FELASA: do inglês *Federation of European Laboratory Animal Science*

GM-CSF: do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HDIR: do inglês *High dose ionizing radiation*

IFN-gama: interferão-gama

IFN tipo 1: Interferão tipo 1

IgM: imunoglobulina M

Igs: imunoglobulinas

IL-1: Interleucina-1

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-4: Interleucina-4

IL-5: Interleucina-5

IL-6: Interleucina-6

IR: do inglês *ionizing radiation*

LDIR: do inglês *Low dose ionizing radiation*

LET: do inglês *linear energy transfer*

MAPK: do inglês *mitogen-activated protein kinase*

MHC: do inglês *Major histocompatibility Complex*

MHC I: MHC de classe I

MHC II: MHC de classe II

NF-κB: do inglês *Nuclear factor kappa B*

NK: do inglês *Natural Killer cells*

PAMP: do inglês *Pathogen-associated molecular Pattern*

PBS: do inglês *Phosphate-buffered saline*

PRR: do inglês *Pattern Recognition Receptors*

SIA: Sistema imune adaptativo

SII: Sistema imune inato

Tc: célula T citotóxica

T CD4⁺: célula T com cluster de diferenciação 4

T CD8⁺: célula T com cluster de diferenciação 8

TCR: do inglês *T cell receptor*

Th: célula T helper

Th1: Célula T helper tipo 1

Th17: Célula T helper tipo 17

Th2: Célula T helper tipo 2

Th9: Célula T helper tipo 9

TNF-alfa: do inglês *Tumor necrosis factor alpha*

Treg: Célula T regulatória

Unidade SI: unidade do Sistema Internacional de unidades

UNSCEAR: do inglês *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation*

UV: radiação ultravioleta

Índice de figuras

Figura 1- Tipos de interação radiação–matéria.....	1
Figura 2- Diferentes curvas dose-resposta para o modelo Linear No-Threshold (A), Linear Threshold model (B), Linear Quadratic model (C) e Radiation Hormesis model (D), conforme artigo de revisão.....	5
Figura 3- Exemplo de um peixe zebra, adaptado de (28).....	10
Figura 4- Resumo dos efeitos observados após irradiação de LDIR, adaptado de anexo 1.....	15
Figura 5- Fotografia real do sistema de manutenção dos peixes zebra usado no trabalho experimental.....	17
Figura 6- Fotografia real do viveiro de artémia usado no trabalho experimental.....	18
Figura 7- Fonte de ⁶⁰ Co selado (modelo ERS® - SPT8580).....	18
Figura 8- Esquema dos grupos experimentais e respetivo controlo.....	19
Figura 9- Fotografia real da estrutura utilizada para a irradiação dos peixes zebra, com vista superior e lateral.....	20
Figura 10- Passos para remover pele e os órgãos da parede abdominal para expor os órgãos internos, adaptado de (43).....	20
Figura 11- Órgãos internos de um peixe adulto masculino, adaptado de (43).	20
Figura 12- Resultado da quantificação de CRP dos grupos sacrificados 1 dia após irradiação (A) com respetiva comparação percentual (B) e dos grupos sacrificados 7 dia após irradiação (C) com respetiva comparação percentual (D). ***, p≤ 0.001; **, p≤ 0.01	25
Figura 13- Resultado da quantificação de IFN-gama dos grupos sacrificados 1 dia após irradiação (A) com respetiva comparação percentual (B) e dos grupos sacrificados 7 dia após irradiação (C) com respetiva comparação percentual (D). *, p≤ 0.05.....	26

1. Introdução

1.1. Radiação

A radiação consiste em energia que se move na forma de ondas ou partículas, que podem ser geradas por fontes naturais ou por dispositivos construídos pelo homem. Pode ser classificada em dois tipos, ionizante e não ionizante. Esta classificação é baseada no potencial de ionização de átomos, ou seja, na capacidade que determinada radiação tem de atravessar matéria e fazer com que esta tenha carga elétrica. Radiação ionizante (ou IR, do inglês, *ionizing radiation*) pode ainda dividir-se em dois outros grupos: diretamente ionizante, consistindo em partículas com carga, como elétrons, prótons, partículas alfa ou íons pesados, e indiretamente ionizante, consistindo essencialmente em partículas ou ondas eletromagnéticas neutras, como neutrões ou fótons (raios-x e raios-gama). A diferença é que, enquanto a IR direta deposita energia através de interações de Coulomb diretas com os elétrons orbitais dos átomos presentes na matéria, a IR indireta ocorre em dois passos: uma partícula carregada eletricamente é libertada no meio, após processo de ionização (por exemplo: fótons libertam elétrons ou positrões, neutrões libertam prótons ou íons pesados) e estas vão depositar energia de forma idêntica à referida anteriormente (1). Estas interações estão representadas na figura 1.

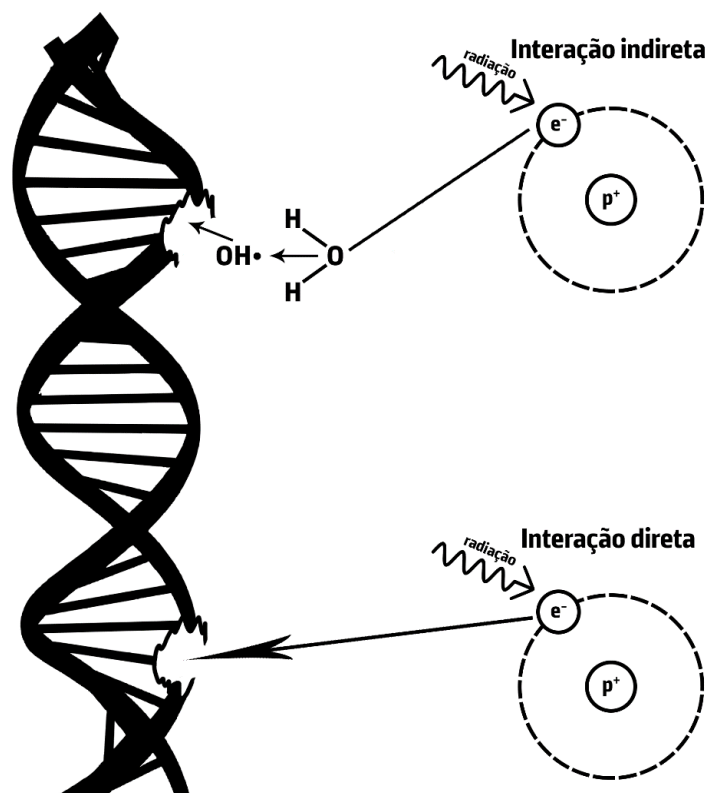


Figura 1- Tipos de interação radiação-matéria

Após a descoberta da radiação, tornou-se evidente que a exposição acima de determinados níveis de IR poderá ter efeitos nocivos a curto e longo prazo em qualquer ser vivo. Em 1895, Wilhelm Roentgen descobriu aquilo que atualmente se conhece como raios-X, e, alguns anos depois, Henri Becquerel descobriu outro tipo de radiação que tinha o urânio como fonte. Poucos anos depois, Marie e Pierre Curie encontraram outras fontes, como polônio e rádio. A este fenómeno, Marie Curie deu o nome de fosforescência natural ou, como é mais comumente conhecido, radioatividade (2).

1.1.1. Radiobiologia

Os Curie acreditavam que a exposição à radioatividade poderia ser utilizada para o alívio da dor, sendo inicialmente utilizada para o tratamento de lúpus, cancro ou outras doenças nervosas, com algum sucesso (2). No entanto, os efeitos negativos começaram a verificar-se pouco depois da descoberta e, em 1903, Pierre Curie foi o primeiro a descrever a síndrome aguda de radiação, dizendo:

“Se alguém deixar uma caixa de madeira ou cartão contendo uma pequena ampulheta de vidro com alguns centigramas de sal no bolso por algumas horas, essa pessoa não vai sentir qualquer efeito. Mas, 15 dias depois, a epiderme nesse local ficará vermelha, e depois em ferida, algo que será muito difícil de curar” (3).

Hoje em dia, a síndrome aguda de radiação é uma das condições clínicas mais estudadas, e muito se sabe sobre os efeitos provocados por IR aos níveis celular, tecidual, de órgãos e de sistemas, através do estudo da radiobiologia (2).

A base da radiobiologia assenta nas suposições de Bergonie e Tribondeau feitas em 1906, também designadas de Lei de Bergonie e Tribondeau, de acordo com as quais, as células que são imaturas, indiferenciadas e que estão ativamente em mitose, como células tronco, são mais radiosensíveis, isto é, são mais suscetíveis à radiação em comparação com células que são maduras, diferenciadas e que não estão ativamente em divisão, como neurónios, que são chamadas de radiorresistentes (4).

A interação entre as células e IR não é absoluta. Por exemplo, uma vez que as células têm mecanismos de reparação, a interação nem sempre resultará em dano permanente. Como tal, podemos afirmar que a interação será probabilística, uma vez que a deposição de energia é feita de forma aleatória (4).

Para caracterizar a qualidade de um raio de IR, na radiobiologia utiliza-se o termo transferência linear de energia ou LET (do inglês *linear energy transfer*) que foca a atenção na taxa linear de absorção energética que o meio irradiado absorve quando é atravessado por este. A unidade utilizada para este parâmetro é kiloeletron volt por micrómetro, ou keV/ μ m. raios X e raios gama são considerados radiações de baixo LET, enquanto neutrões, prótons e íons pesados são radiações de alto LET. O valor que separa as duas designações é de 10 keV/ μ m. Com o aumento do LET, a capacidade de produzir danos biológicos também aumenta. A presença ou ausência de oxigênio também influencia o efeito biológico, aumentando-o. No entanto, esta elevação vai depender do LET do raio, tendo um efeito mais dramático quanto menor for o LET. Quanto maior for o LET, mais negligenciável será o aumento do efeito biológico provocado pelo oxigênio (1).

Para medir IR, existem 3 unidades diferentes. Para medir radioatividade, a unidade SI utilizada é Becquerel, Bq, e a unidade utilizada anteriormente era Curie, Ci. Para medir dose absorvida, Gray, Gy, é a unidade SI, e rad é a unidade antiga. Esta unidade consiste na quantidade de energia absorvida por massa (1 Gy=1 J/kg). Para medir dose efetiva/equivalente, utiliza-se Sievert, Sv, e rem é a unidade antiga. Esta unidade é semelhante à anterior, no entanto, tem em conta a eficácia biológica de diferentes tipos de radiação a tecidos, multiplicando a dose absorvida por um fator de qualidade. Quando a radiação é de LET baixo, é possível afirmar que 1 Sv = 1 Gy (1).

Não existe nenhum tipo específico de dano associado a IR, qualquer dano que resulte da exposição pode resultar de outras fontes, como térmica, química ou física. A interação entre IR/célula pode resultar de duas maneiras, direta e indiretamente.

A interação direta ocorre quando a IR interage com alvos críticos da célula, como o ácido desoxirribonucleico (ADN) ou uma proteína, afetando diretamente a funcionalidade e viabilidade da célula. Quando as células se encontram na fase M da mitose (1 de 4 fases), na qual estas se dividem em duas, os cromossomas estão condensados e emparelhados, ficam num estado mais radiosensível, sendo mais suscetíveis a este tipo de interações. É também por isso que células cancerígenas são altamente suscetíveis a IR, resultado de uma ocorrência de mitose anormalmente alta e aumento de cromatina. Este processo é dominante quando a interação se dá entre IR de alto LET e matéria biológica (4).

A interação indireta ocorre quando IR interage com outras moléculas ou átomos da célula. Como 80% da célula é constituída por água, será com esta molécula que haverá a grande parte das interações. Como resultado, formam-se radicais livres como H_2O^+ (ião água) ou $OH\cdot$ (radical

hidroxilo) que por sua vez interagem com outras estruturas da célula, quebrando ligações químicas e levando a alterações que podem resultar em danos biológicos. Este processo é dominante quando a interação se dá entre IR de baixo LET e matéria biológica (1).

Células irradiadas, independente de interação direta ou indireta com a célula, podem ter quatro resultados diferentes: sem efeito; atraso da divisão; falha na reprodução e morte interfásica. Atraso da divisão celular é o primeiro efeito observável de exposição a IR, que normalmente ocorre em doses superiores a 0.5 Gy até 3 Gy. Quando o atraso se dá, por vezes, a célula pode recuperar. Falha reprodutiva de uma célula é baseada na dose, e abaixo de 1.5 Gy, este efeito é aleatório e não linear. Quando em doses superiores a 1.5 Gy, o efeito torna-se linear e previsível, e a ocorrência deste efeito aumenta com a dose. Morte interfásica pode ocorrer várias gerações após exposição, por apoptose, consequência do envelhecimento celular, ou porque um mecanismo crítico de replicação celular foi alterado. O tipo de célula e a dose irradiada influencia o resultado, com células radiosensíveis a demonstrar morte interfásica a doses menores que células radorresistentes. Este último efeito é mais comum em linfócitos (4).

Os efeitos da radiação na população humana podem ser classificados como somáticos, sendo sentidos pelos indivíduos irradiados, ou genéticos/hereditários, que são mutações em genes que podem contribuir para o nascimento de descendentes com deficiência (1).

Os danos causados por irradiação podem ser estocásticos, ou seja, de natureza aleatória, ou determinísticos/previsíveis. Efeitos determinísticos estão normalmente associados à morte celular. Estes efeitos têm um limiar. Abaixo do limiar o efeito não será aparente, e acima do limiar, a severidade dos efeitos aumenta com a dose. Alguns exemplos incluem anorexia, náusea e vômitos, que são exemplos de síndrome aguda de radiação. Efeitos estocásticos, ao contrário dos anteriores, não têm uma dose limiar para que aconteçam, e a severidade é independente da dose. No entanto, a probabilidade deste efeito ocorrer aumenta com o aumento da dose. Exemplos incluem indução de cancro ou mutações genéticas hereditárias (5).

Existem diversas teorias sobre possíveis tipos de modelos dose-resposta diferentes, que explicam os diferentes efeitos de exposição a IR, representadas na figura 2, a saber:

- Modelo *Linear No-Threshold*: Qualquer dose de IR pode causar efeitos nocivos;
- Modelo *Linear Threshold* : Existe um limite conhecido e abaixo deste não existem quaisquer efeitos;
- Modelo *Linear Quadratic* : Não existe limite, a resposta a baixas doses é linear e a altas doses é quadrática;

- Modelo *Radiation Hormesis*: Resposta bifásica, até determinada dose existem efeitos positivos, e depois de um limite, os efeitos resultantes serão negativos.

Apesar de haver alguma contradição sobre a utilização destes modelos, o modelo mais utilizado para explicar a reação das células humanas à exposição de IR é o modelo *Linear Quadratic* (4).

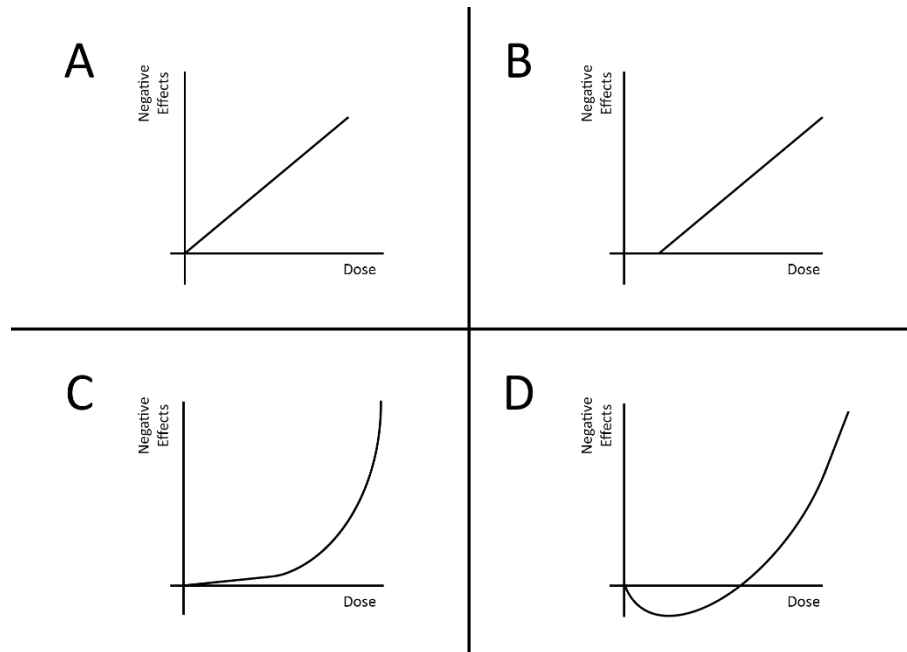


Figura 2- Diferentes curvas dose-resposta para o modelo *Linear No-Threshold*(A), *Linear Threshold model*(B), *Linear Quadratic model*(C) e *Radiation Hormesis model* (D), conforme artigo de revisão

1.1.2. Baixas doses vs Altas doses de Radiação ionizante

Em 2012, o Comité Científico das Nações Unidas sobre os Efeitos da Radiação Atômica (UNSCEAR, do inglês *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation*) define baixa dose de radiação ionizante (LDIR, do inglês *Low dose ionizing radiation*) como qualquer dose inferior a 100 mGy (6). No entanto, existem múltiplos artigos de 2012 que utilizam diferentes medidas de LDIR, definindo LDIR como <200 mGy (7), <500 mGy (8,9), <1 Gy (10), entre outras doses ou critérios que têm vindo a ser aplicados. Acrescentando toda a documentação publicada antes de 2012 que utilizava uma definição diferente (11-14), (anteriormente, a dose limite mencionada era de 200 mGy), é possível que o conhecimento atual sobre LDIR esteja distorcido por estas contradições e alterações de conceções.

Por outro lado, o conhecimento sobre os efeitos de alta dose de radiação ionizante (HDIR, do inglês *High dose ionizing radiation*) estão bem documentados, resultado de um grande foco no estudo de radioterapia e grandes incidentes relacionados, como o bombardeamento de Hiroshima e Nagasaki em 1945, ou o acidente nuclear de Chernobyl em 1986, combinado com a

disponibilidade de dados, a preocupação da população geral e a urgência das situações, tendo havido um esforço aumentado para a documentação dos efeitos de HDIR. Como os efeitos de LDIR não eram tão facilmente observáveis, nem de tanta urgência, o estudo destas doses foi sendo algo negligenciado.

1.2. Sistema Imune

Um dos alvos principais de IR é o sistema imune, uma vez que as suas células estão constantemente em estado imaturo, em diferenciação ou em proliferação. O sistema imune consiste numa coleção de células, tecidos e moléculas responsáveis pela proteção do organismo contra diferentes agentes nocivos – sejam vírus, bactérias, moléculas ambientais ou radiação – através de uma resposta coordenada, denominada de resposta imune. Assim, é sabido que o sistema imune tem como funções a defesa contra infeções e tumores; controlo da regeneração tecidular e cicatrização; reconhecimento e resposta de transplantes e manutenção da homeostase dos tecidos. Por seu lado, este sistema é também responsável pela indução de danos celulares e indução de inflamação patológica, causando respostas alérgicas, doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias (15, 16).

O sistema imune pode ser dividido em dois subgrupos: sistema imune inato (SII) e sistema imune adaptativo (SIA).

O SII consiste na primeira linha de defesa, e a sua resposta a agressões agudas ou persistentes normalmente resulta em inflamação. Inflamação é um processo evolutivo ancestral que envolve a ativação, recrutamento e ação de células imunes, inatas e adaptativas. Para além de ser essencial para a defesa contra agentes nocivos, é igualmente importante para a reparação, regeneração e remodelação de tecidos (17). Células do SII incluem granulócitos, monócitos/macrófagos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK). Granulócitos são células caracterizadas pela presença de grânulos no citoplasma e incluem 4 tipos: neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos (18). Neutrófilos constituem a maioria dos leucócitos sanguíneos e são as primeiras células a ser recrutadas para o local de urgência imune, sendo responsáveis pela eliminação de patógenos através processos conservados biologicamente como fagocitose e desgranulação e são também capazes de regular as funções de macrófagos e células B (19). Eosinófilos são células pleiotrópicas altamente conservadas, com função chave na eliminação de parasitas como helmintos e têm papel patogénico no desenvolvimento de doenças alérgicas. Em estudos recentes, têm demonstrado ter função anti tumoral (20). Basófilos e mastócitos são

células que, da mesma forma que os eosinófilos, têm papel patogénico em doenças alérgicas. Enquanto os mastócitos são células residentes, atuando no local onde se encontram, basófilos são circulantes e necessitam de ser recrutados para os tecidos. Estas células libertam histamina, proteína-chave de reações alérgicas (21).

Monócitos são leucócitos capazes de se diferenciar em macrófagos e células dendríticas. Estas servem 3 funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas. Células dendríticas são células apresentadoras de antígenos com uma potente plasticidade funcional e atuam como intermediários entre respostas imunes inatas e adaptativas (22).

Células NK são células da mesma linhagem dos linfócitos T e B, e são capazes de destruir múltiplas células adjacentes, assim como de potenciar respostas de anticorpos e células T, demonstrando ser agentes anti tumorais importantíssimos.

Para além das células, o SII é composto de barreiras químicas e físicas, como a pele, enzimas antimicrobianas e ainda o sistema complemento. O sistema complemento, assim como as células dendríticas, funcionam como ponte entre o SII e SIA. Este é constituído por 30 proteínas que ajudam/complementam a função dos anticorpos, ativando uma cascata de reações bioquímicas que levam à lise de agentes patogénicos. Outra função deste sistema é a atração de células imunes como macrófagos e neutrófilos, para o local de infeção(18).

Quando comparado com o SII, o SIA é um sistema mais evoluído e complexo que consiste em células e proteínas, que atuam especificamente no alvo e destroem-no. A característica chave deste sistema é a capacidade de memorizar a estrutura molecular única de um patógeno, permitindo uma resposta rápida a futuras invasões do mesmo patógeno. Este sistema inclui linfócitos T e B e pode ser dividido em 2 tipos: mediada por células e humoral (15, 18).

Células T têm um papel fundamental na resposta mediada por células, quer seja por regulação das funções de outros linfócitos ou atuando diretamente, matando células infetadas. A interação célula-patógeno ocorre em recetores específicos, denominados de *T cell receptors* (TCR). As células T podem ser divididas em duas populações, célula T com cluster de diferenciação 8 (T CD8⁺), quando ativadas, diferenciam-se em células T citotóxicas (Tc), e célula T com cluster de diferenciação 4 (T CD4⁺), que se diferenciam em células T helper (Th). Células Tc são ativadas por péptidos derivados de antígenos intracelulares e apresentados pelo complexo superior de histocompatibilidade (MHC do inglês *Major histocompatibility Complex*) de classe I (MHC-I), e a sua função é a de matar células infetadas. Estas células são cruciais na defesa contra infeções virais. Células Th são estimuladas por péptidos de antígenos extracelulares apresentados por

MHC de classe II (MHC-II), e regulam as respostas de outros leucócitos. Elas vão estimular a atividade de macrófagos, granulócitos, células Tc e células B através da produção de citocinas. Após ativação, células Th podem diferenciar em célula T helper tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), tipo 9 (Th9), tipo 17 (Th17) e célula T regulatória (Treg), dependendo do tipo de resposta necessária (anti ou pró-inflamatória) (23).

Células B medeiam a imunidade humoral secretando anticorpos/immunoglobulinas (Igs), ou na forma de recetor membranar, denominado *B cell receptor* (BCR). Existem diferentes tipos de anticorpos, dependendo da resposta imune, do tipo de patógeno e do próprio hospedeiro (mamíferos têm tipos de anticorpos diferentes de peixes, por exemplo). Os anticorpos vão induzir a neutralização, internalização e eliminação dos patógenos. São também capazes de ativar o sistema complemento (23).

Citocinas são pequenas proteínas que são produzidas por quase todas as células do corpo e ajudam a regular e influenciar a resposta imune. Citocinas são pleiotrópicas, o que significa que os seus efeitos dependem da célula que os recebe. As citocinas não têm uma célula produtora única, sendo que uma citocina específica pode ser produzida e secretada por várias células diferentes. Por exemplo, fator de necrose tumoral-alfa, (TNF-alfa, do inglês *Tumor necrosis factor-alpha*) pode ser produzida por neutrófilos, monócitos/macrófagos, células T, B, NK, endoteliais, epiteliais e dendríticas (24).

O sistema imune tem a capacidade de distinguir o próprio do estranho. Células do sistema imune inato têm recetores, denominados de recetores de reconhecimento de padrão (PRR, do inglês *pattern recognition receptors*) através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) (25). Em caso de infecção extracelular, a deteção destes PAMPs por células imune locais vai ativar a secreção de citocinas, como TNF-alfa, IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6), quimiocinas e interferão gama (IFN-gama). Estas citocinas vão recrutar neutrófilos, monócitos/macrófagos, e enquanto alguns destes fagócitos ativados vão destruir a fonte dos PAMPs, outros vão limitar a inflamação e iniciar reparação de tecido. A interleucina 12 (IL-12) também será secretada, que irá ativar células NK. Estas células vão mediar a resposta, matando as células infetadas e produzindo IFN-gama, que irá ativar macrófagos de modo a matar quaisquer agentes inflamatórios fagocitados. Em caso de infecção viral, dar-se-á também a inibição de replicação viral através da secreção de interferão tipo 1 (IFN tipo 1) (15). Por vezes, em situações de reação exagerada a um patógeno, eosinófilos, mastócitos e basófilos serão recrutados para o local, libertando fatores

inflamatórios(21). Tudo isto é feito para isolar células e tecidos infetados e inativar o patógeno invasor. Caso a resposta inicial não seja suficiente, o SIA entra em ação.

As células apresentadoras de antígeno processam as proteínas em péptidos, apresentando-os na superfície celular através do Complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*). Existem duas classes de MHC: MHC classe I, que é expresso por todas as células nucleadas e apresenta antígenos intracelulares, e MHC classe II, expresso apenas por certas células, como células dendríticas, fagócitos células B e células endoteliais, e apresenta antígenos extracelulares. (15, 22)

A apresentação por MHC classe I leva à ativação de células T CD8⁺ que induzem diretamente a apoptose em células afetadas. A apresentação por MHC classe II é mais complexa e pode levar à ativação de diferentes tipos de células T CD4⁺ (como Th1, Th2 e Th7) dependendo do tipo de infecção. Cada tipo de célula Th tem funções específicas na resposta imune, dependente do tipo de agente infeccioso (15, 23).

As células B podem ser ativadas de forma independente ou dependente de células Th, resultando na produção de anticorpos de baixa ou alta afinidade, respetivamente. Num primeiro encontro com o antígeno, a ativação é predominantemente independente, sendo por isso mais lenta, uma vez que os anticorpos são de baixa afinidade. No entanto, durante o primeiro encontro, existem interações dependentes, que contribuem para a diferenciação de células B de memória, responsáveis pela produção de anticorpos de alta afinidade, e com a finalidade de formar memória imunológica. No segundo encontro com o antígeno, a ativação será apenas dependente e como resultado, a resolução será mais rápida (26).

1.3. Peixe zebra

Peixe zebra, de nome científico *Danio rerio*, é um peixe teleósteo pertencente à família *Cyprinidae*. Nativo do sul da Ásia, é um peixe tropical distribuído em habitats de água doce, na Índia, Bangladesh e Nepal (27).

Peixes zebra adultos têm normalmente coloração prateada ou dourada (menos comum), com várias riscas de tons azuis/roxos, que se estendem do opérculo até a base da barbatana dorsal. No seu dorsal, apresentam tons escuros de castanho-amarelado ou verde-azeitona, evidentes da cabeça até à barbatana caudal. Comparativamente, as fêmeas são ligeiramente maiores, não excedendo comprimento de 3 a 4 centímetros, de coloração mais prateada e ligeiramente arredondados, ao passo que os machos são menos arredondados e usualmente de coloração

mais viva (28). Ainda assim, o mecanismo de determinação sexual é desconhecido, uma vez que estes não têm cromossomas heteromórficos, indicando que não existe nenhum cromossoma de determinação sexual claro, como os seres humanos possuem (27).

Em adição ao fator genético, a determinação sexual dos peixes zebra pode ser influenciada por efeitos ambientais que influenciem parâmetros biológicos como a expressão de hormonas (29) ou a temperatura corporal (30).

São omnívoros, e demonstram ter reprodução duradoura e prolífica em cativeiro. Como tal, através de uma nutrição eficiente e manipulação dos ciclos de luz, facilmente os peixes serão capazes de se reproduzir. Após o período sem luz, a iluminação inicial em conjunto com uma fricção persistente do peixe macho com a fêmea, as fêmeas libertam as ovas, que serão depois fertilizadas pelos machos (28).



Figura 3- Exemplo de um peixe zebra, adaptado de (28).

O peixe zebra foi introduzido pela primeira vez como um modelo animal nos inícios de 1980, por George Streisinger e seus colegas (31, 32), para estudos genéticos. Desde então, o aumento da resolução do seu genoma, a criação de tecnologias avançadas de manipulação genética, como o CRISPR/Cas9 (do inglês *Clustered regularly interspaced palindromic repeats/caspase 9*) (33, 34) e de tecnologias de sequenciação genética, aliados ao facto do peixe zebra ter genes ortólogos para cerca de 70% do genoma humano, tornaram-no num modelo excelente para compreender doenças genéticas humanas (35). Outras características, como as suas dimensões reduzidas, requisitos de manutenção simples, facilidade de reprodução com alta quantidade de embriões resultantes por ciclo, transparência de embriões, entre outras, tornam o peixe zebra num organismo altamente atraente como modelo de estudo (28).

1.3.1. Sistema imune e peixe zebra

Os peixes teleósteos, como o peixe zebra, representam um grupo heterogéneo que ocupa um ponto central entre o SII e a emergência da resposta imune adaptativa, sendo por isso os vertebrados mais primitivos que possuem sistema imune adaptativo. Como tal, podemos encontrar nestes animais órgãos imunes homólogos aos do sistema imune mamífero. Estes peixes possuem sistema imune inato e adaptativo, no entanto o primeiro é mais forte que o segundo (36).

Nestes organismos, o sistema imune está altamente conservado, com apenas algumas diferenças. Num ponto de vista de órgãos imunes, tanto o peixe zebra como os mamíferos têm o timo como um dos órgãos principais. No entanto, enquanto a hematopoiese nos mamíferos ocorre na medula óssea, nos peixes, esta acontece no rim cefálico (37). O peixe zebra também não tem nódulos linfáticos e, como tal, o rim cefálico assume também o papel dos nódulos, que é onde ocorre a fagocitose, processamento de Igs e formação de imunoglobulina M (IgM) e memória imunitária. O timo dos peixes zebra tem função idêntica ao timo dos mamíferos, responsável pela maturação de linfócitos T e rejeição de aloenxertos. O baço está também presente nos peixes zebra, tendo papel vital na hematopoiese, degradação de Igs, processamento da produção de Igs e devido à ausência de nódulos linfáticos, é essencial para a captura destes (36). O sistema complemento, tal como nos mamíferos, tem um papel crucial na ligação entre o sistema imune inato e adaptativo, e tem diversos elementos partilhados com os de humanos (38).

Relativamente à linhagem mieloide, os peixes têm neutrófilos e monócitos/macrófagos bastante semelhantes, com pequenas alterações como o número de núcleos nos neutrófilos. Eosinófilos, apesar de terem funções semelhantes, são morfologicamente diferentes (38). Mastócitos também foram identificados, e estes demonstram algumas funções semelhantes em respostas inatas e adaptativas à dos mamíferos (39). No entanto, não produzem histamina (37). Os basófilos não foram ainda identificados em peixes zebra, ao contrário das outras células (40). A linhagem linfoide é também bastante semelhante. Células T parecem estar altamente conservadas, com genes dos recetores de células T com grande repertório, com marcadores celulares homólogos de CD8, CD4, cluster de diferenciação 28 (CD28), entre outros (36). Células B demonstram menor conservação, com diferenças nos subtipos de Igs, (A, D, G, E, M em mamíferos e D,M e Z, nos peixes zebra). Estas células são também incapazes de fazer alterações de classe de Igs por recombinação, algo que as células de mamíferos são capazes de fazer (38).

Outros fatores, como MHC, com a existência das classes I, II e III de MHC, e citocinas, como IFN-gama ou TNF-alfa estão bem conservados (38). No entanto, o efeito de citocinas ainda é controverso (41). Apesar de diversas citocinas, importantes para a hematopoiese, inflamação e imunidade adaptativa estarem presentes em peixes teleosteos, em muitos casos, os genes detetados não são verdadeiros homólogos. No caso do peixe zebra, as citocinas estudadas já estudadas, como é o caso de IFN-gama, TNF-alfa, interleucina-10 (IL-10), demonstram funções imunes semelhantes ou iguais às citocinas homólogas de vertebrados.

1.4. Objetivos

Uma vez que o conhecimento sobre o efeito de LDIR no sistema imune é ainda reduzido, aliado ao facto de a própria definição de LDIR ser um tema controverso, não é possível afirmar como um organismo atuará quando afetado por LDIR. Como tal, o principal objetivo deste trabalho é criar uma base sólida para a investigação dos efeitos biológicos de baixas doses de radiação ionizante utilizando o peixe zebra como modelo em estudo, e ajudar a clarificar alguns dos mecanismos que ocorrem na interação entre a radiação ionizante e o sistema imune.

Para tal, iniciou-se o trabalho com uma revisão bibliográfica de modo a ajudar a criar um desenho inicial da interação LDIR-sistema imune. Com base nesse trabalho prévio, aprimorou-se o desenho do trabalho experimental, com o objetivo principal de estudar a influência de LDIR na expressão de proteína C reativa (CRP, do inglês, C-reactive protein) e IFN-gama. De um modo mais específico, pretendeu-se avaliar a influência da dose de LDIR na expressão de proteína C reativa e de IFN-gama, e do tempo decorrido após a irradiação nas eventuais alterações de expressão dos biomarcadores avaliados.

2. Artigo de revisão

Foi feito um artigo de revisão no âmbito desta dissertação, de modo a desenhar possíveis mecanismos para os efeitos de LDIR nos diferentes componentes do Sistema Imune e, assim, conseguir determinar parâmetros relevantes para estudo para a componente experimental desta dissertação – ver anexo 1.

2.1. Metodologia de pesquisa

Inicialmente, foi feita uma recolha de artigos com o motor de busca do Web of Science™, utilizando termos de busca Boolean específicos:

- Artigos de pesquisa sobre sistema imune e IR:
 - (TS= ("Immune system") OR TS=("immunity") OR TS=("immune cells") OR TS=("immune cell")) AND (TS=("ionizing radiation") OR TS=(radiation biology))
- Artigos de pesquisa sobre sistema imune e LDIR:
 - ((TS= ("Immune system") OR TS=("immunity")) AND (TS=(ionizing radiation) OR TS=(radiation biology))) AND (TS=("low dose radiation") OR TS=("low dose ionizing radiation"))

Estes termos foram utilizados de modo a excluir todos os artigos irrelevantes, mantendo o máximo de artigos relacionados com o tema. Utilizando as capacidades do motor de busca, artigos identificados como sendo de revisão foram excluídos.

Dos artigos resultantes, 100 artigos foram seleccionados. De modo a fazer uma segunda seleção de artigos, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- Artigos relativo a trabalhos científicos de campo, não de revisão;
- Artigos com foco primordial no estudo da interação sistema imune-LDIR;
- Artigos com menção a pelo menos um resultado induzido por uma irradiação com uma dose ≤ 100 mGy, apresentado de forma clara e facilmente distinguível de outros resultados.

Dos artigos restantes, foram recolhidos dados e resultados relevantes, organizados de acordo com as seguintes variáveis: modelo de estudo utilizado; dose, fonte e forma de irradiação; biomarcador avaliado; o método de estudo utilizado e resultados principais.

2.2. Síntese dos resultados

Dos 100 artigos selecionados, apenas 45 passaram a seleção final, sendo que 34 dos artigos foram rejeitados devido à utilização de doses superiores a 100 mGy – critério de exclusão que se mostrou mais frequentemente utilizado. Os 45 artigos utilizaram essencialmente quatro modelos: humanos (9 artigos) e/ou células do mesmo (6 artigos); roedores (27 artigos) e/ou células dos mesmos (5 artigos).

Foram utilizadas doses absorvidas entre 0,15 μ Gy e 100 mGy, sendo a última a dose mais estudada, num total de 94 irradiações diferentes, descritas nos estudos incluídos. Destas, 54 foram agudas e 40 foram crónicas. Mais de metade das irradiações utilizaram geradores de raios x e raios gama, com outros artigos a utilizarem fontes diferentes, nomeadamente fontes radioativas externas ou internas.

Os biomarcadores estudados foram divididos em três grupos: citocinas; contagens celulares; expressão génica/produção proteica e outros parâmetros (por exemplo, atividade celular).

As citocinas mais aumentadas foram IFN- γ , Fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), interleucina 5 (IL-5) e IL-6, maioritariamente irradiadas por irradiação aguda. As citocinas mais reduzidas foram interleucina 4 (IL-4), maioritariamente reduzido por irradiação aguda, e TNF- α maioritariamente reduzido por radiação crónica.

As células mais afetadas positivamente foram células NK, linfócitos e mono/macrófagos. As células mais afetadas negativamente foram células T CD8⁺, células DC e esplenócitos.

Os restantes parâmetros mais afetados positivamente foram fosforilação da via MAP quinase (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*), produção de NO (verificados apenas após irradiação aguda) e expressão de fator nuclear kappa B (NF- κ B do inglês *Nuclear factor kappa B*).

Os restantes parâmetros mais afetados negativamente foram crescimento de tumor primário e secundário (por irradiação aguda) e expressão de glutathiona peroxidase 1 (GPX-1) e superóxido dismutase 2 (SOD-2) (apenas por irradiação crónica). Estes resultados foram resumidos e apresentados na figura 4.

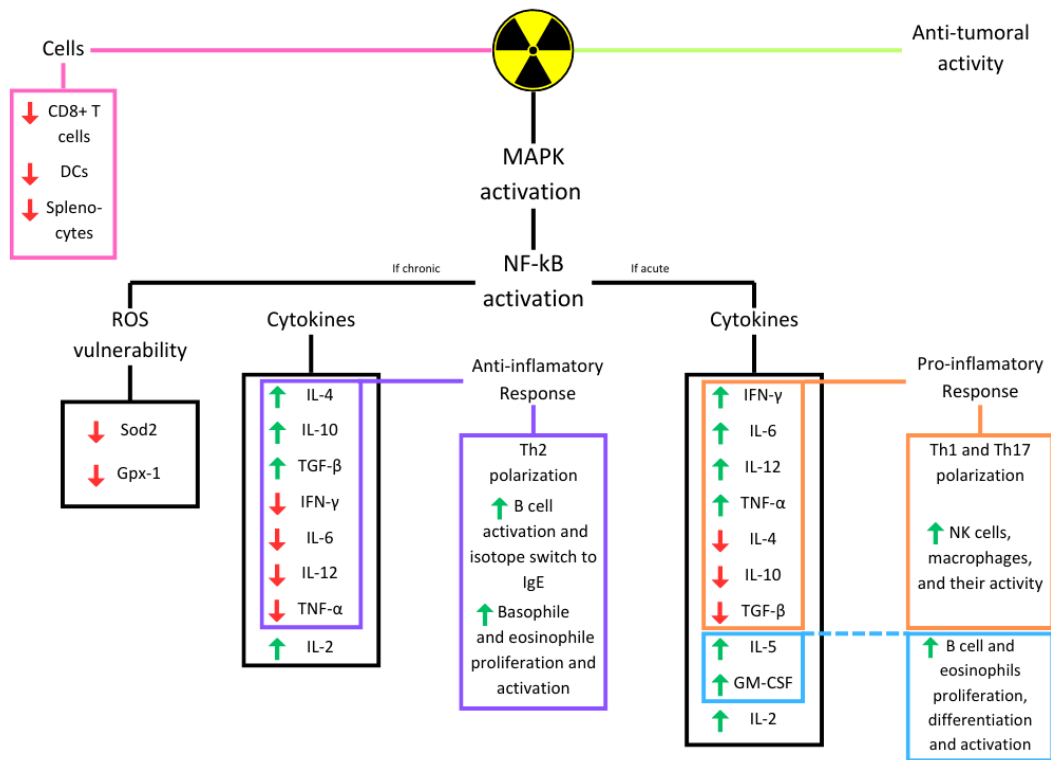


Figura 4- Resumo dos efeitos observados após irradiação de LDIR, adaptado de anexo 1

2.3. Conclusão do artigo

A irradiação com LDIR parece ativar as vias de sinalização MAPK e NF-κB, que induzem a proliferação, ativação e polarização de células imunes, assim como a produção de citocinas. Estes resultados estão dependentes do facto da irradiação ser aguda ou crónica. Quando aguda, LDIR demonstra induzir uma resposta pró-inflamatória, com aumento de citocinas como IFN-γ, diferenciação e shift de linfócitos para subtipos pró-inflamatórios, assim como um aumento na proliferação e atividade citotóxica de células NK e macrófagos. No entanto, parece provocar decréscimos nas contagens celulares de esplenócitos, células T CD8⁺ e células dendríticas. Demonstra também induzir uma reação adaptativa protetora contra mais irradiação e, quando combinada com radioterapia, LDIR parece ter atividade anti tumoral.

Quando crónica, LDIR demonstra induzir uma resposta anti-inflamatória, com decréscimos de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa e aumentos de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (interleucina 10) e IL-4, diferenciação e shift de linfócitos para subtipos anti-inflamatórios, ativação e proliferação de linfócitos B, eosinófilos e basófilos.

2.4. Apresentação e publicação do artigo

Este artigo foi apresentado nas “1 Jornadas do CISA: “Jovens com a Ciência” no formato de E-Poster, sob o nome “Low Dose Ionizing Radiation (LDIR) and the immune system: a review”, no dia 30 de junho de 2023, na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (Anexo 2). A versão do artigo disponível no Anexo 1 está em fase de preparação para submissão para publicação, sob o mesmo nome, à revista “International Journal of Radiation Biology” (ISSN 0955-3003).

3. Material e métodos

3.1. Origem dos peixes zebra

Os peixes zebra utilizados neste estudo foram criados e fornecidos pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, num processo gerido e articulado com o Laboratório do Professor Doutor António Paulo Alves Ferreira de Carvalho. Todos os animais utilizados provêm da mesma postura, tendo-se iniciado as experiências com idade de 78 dias pós fertilização, sendo por isso considerados peixes juvenis/adultos jovens.

3.2. Manutenção dos peixes zebra

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em aquários de 4 litros, ficando cada um com 10 peixes, num sistema de recirculação de água, equipado com um filtro físico, esterilizador ultra violeta (UV) e aquecimento, como demonstrado na figura 5.



Figura 5– Fotografia real do sistema de manutenção dos peixes zebra usado no trabalho experimental

A temperatura da água foi mantida entre 26.5 e 28°C, o pH entre 7 e 8,5 e foram submetidos a um fotoperíodo de 14h de luz e 10 horas de escuro. Os peixes foram alimentados 2 vezes ao dia, com alimentação granulada disponível comercialmente própria para peixes zebra, complementada com nauplios de artémia na primeira alimentação, que foram criados num viveiro e posteriormente congelados. Foram realizadas medições diárias de parâmetros de qualidade da água, como pH, utilizando um potenciómetro medidor do pH (Medidor edge® para pH/ORP, Hanna Instruments®); temperatura utilizando um termómetro submerso manualmente no

reservatório de água; e níveis de amónia e/ou nitratos, que são indicadores de stress, utilizando testes colorimétricos (sera®).

3.3. Manutenção do viveiro de artémia

A criação de artémia foi mantida em paralelo com a manutenção dos peixes num viveiro, demonstrado na figura 6.



Figura 6 – Fotografia real do viveiro de artémia usado no trabalho experimental.

A água salgada foi preparada com uma concentração de 30 g de sal por litro, e a cada litro acrescentaram-se 2 colheres de café de ovos de artémia, esperando um período entre 18h a 48h até os ovos eclodirem. O viveiro está equipado com aquecimento, uma bomba de ar e uma fonte luminosa. A água e os ovos foram sendo repostos consoante as necessidades operacionais.

3.4. Irradiação dos peixes

No momento da irradiação, os peixes foram realocados para aquários de 1L, na concentração de 5 peixes por 300 ml. Estes foram colocados numa sala isolada, por questões de proteção radiológica, com controlo do fotoperíodo idêntico ao usado na manutenção geral dos peixes, onde foram irradiados externamente com uma fonte selada de ^{60}Co (ERS® - SPT8580) (figura 7).



Figura 7 – Fonte de ^{60}Co selado (modelo ERS® - SPT8580)

De acordo com protocolo de irradiação externa adaptado de versão já validada no artigo de Gomes, Abrantes et al. (42), os peixes foram irradiados, tendo-se calculado a dose absorvida referente a essa irradiação respeitando a seguinte fórmula:

Equação 1- Cálculo da dose de exposição externa a radiação, adaptado de (42)

$$D = \Gamma \frac{A \times t}{d^2}$$

na qual D indica dose de exposição (em mGy); Γ indica a constante específica de radiação; A indica a radioatividade da fonte (em GBq); t o tempo de exposição (em h) e d a distância da fonte até ao alvo (em m).

Os peixes foram divididos em 4 grupos de 20 peixes (10 peixes irradiados + 10 de controlo), representados na seguinte figura:

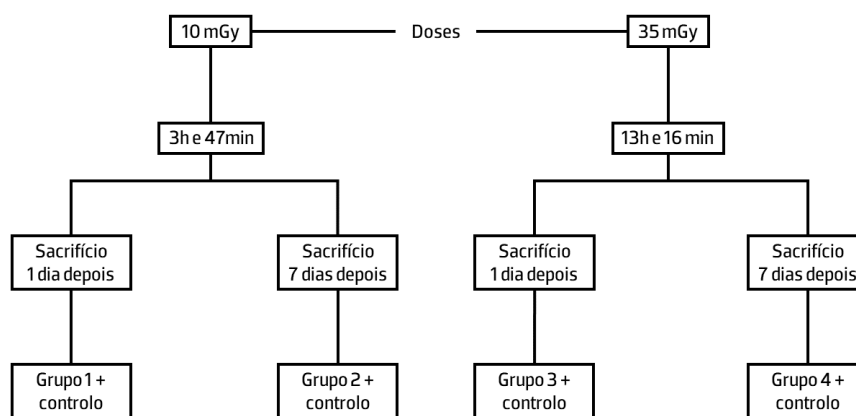


Figura 8- Esquema dos grupos experimentais e respetivo controlo

Os peixes foram irradiados de forma contínua com doses absorvidas de 10 e 35 mGy e, para tal, seguindo a equação 1, os aquários estiveram expostos a um fluxo constante de radiação gama emitida pela fonte durante 3h e 47min e 13h e 16min, respetivamente. Uma vez que seguimos a mesma abordagem do artigo acima mencionado, as condições de irradiação permitem-nos obter uma estimativa de dose absorvida que foi calculada numa logica de *worst case scenario*, portanto, dose absorvida máxima a considerar em cada ensaio.

Os peixes de controlo foram submetidos a um tratamento idêntico, fazendo-se todo o protocolo em paralelo aos peixes de estudo, nomeadamente no que diz respeito à transferência de aquário, movimentação entre salas e controlo de fotoperíodo, de modo a controlar o número de variáveis existentes. A estrutura utilizada para a irradiação pode ser observada na figura 9.



Figura 9– Fotografia real da estrutura utilizada para a irradiação dos peixes zebra, com vista superior e lateral

3.5. Sacrifício e preparação das amostras de material biológico

Nos períodos de 1 e 7 dias após irradiação, 10 animais de cada grupo foram sacrificados rapidamente por choque térmico, através da imersão em gelo, tendo-se terminado o sacrifício 10 minutos após a imersão, garantindo-se, por observação direta, a ausência de qualquer evidência de movimento pela totalidade dos animais. Cada peixe foi pesado com recurso a uma balança analítica (Adam Equipment® - PW 184) e, seguindo o protocolo do artigo de Gupta and Mullins (43), procedeu-se à dissecação dos peixes.

Seguindo os passos apresentados na figura 10, os peixes foram dissecados, fazendo uma abertura que desde a barbatana anal do peixe até ao opérculo (passo 1). De seguida, a barbatana peitoral, a cintura peitoral e o opérculo foram removidos (passo 2). Terminando, cortou-se a pele ao longo do peixe até à barbatana anal (passo 3).

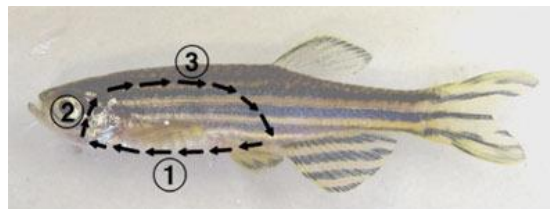


Figura 10– Passos para remover pele e os órgãos da parede abdominal para expor os órgãos internos, adaptado de (43).

Removendo a pele, foram recolhidos o baço e o trato gastrointestinal, que inclui o fígado, o intestino e a vesícula biliar, apresentados na figura 11. O material recolhido foi pesado e congelado a -80°C para posterior análise.

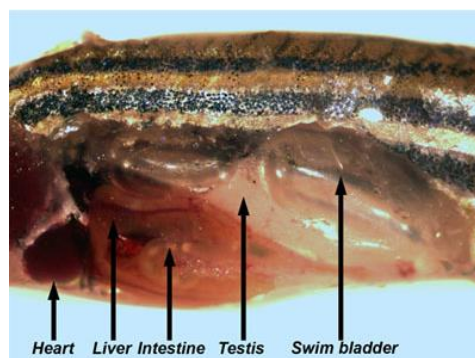


Figura 11– Órgãos internos de um peixe adulto masculino, adaptado de (43).

3.6. Análise dos parâmetros

Antes da análise, os tecidos foram homogeneizados em 200 µL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate-buffered saline*) com trituração mecânica com apoio de pipeta e vortex. De seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 3000 rpm por aproximadamente 20 min, e o sobrenadante foi recolhido.

Para as análises de IFN-gama e da CRP, foram utilizados os kits de *Enzime-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) "Fish C Reactive Protein (CRP) ELISA Kit" (My Bio Source®) e "Zebrafish IFNγ (Interferon Gamma) ELISA Kit" (Neo Biotech®). Cada análise foi feita em duplicado, utilizando 10 peixes (5 experimentais, 5 de controlo) de cada grupo experimental.

3.6.1. Análise da expressão de CRP por ELISA

Para a análise da CRP, utilizou-se um teste ELISA tipo sanduiche, com peroxidase de rábano (HRP, do inglês horseradish peroxidase) conjugado diretamente no anticorpo. Uma primeira incubação da amostra foi iniciada com o anticorpo conjugado com HRP, durante 60 min a 37°C. Após lavagem dos poços, uma segunda incubação foi baseada em soluções do substrato, misturando ligeiramente e deixando a placa no escuro durante 15 min a 37°C. Após paragem da reação com uma solução para o efeito, foi feita uma leitura da densidade ótica a 450 nm com recurso a leitor de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer).

3.6.2. Análise da expressão de IFN-gama por ELISA

Para a análise de IFN-gama, utilizou-se um teste ELISA sanduíche semelhante, com um anticorpo conjugado com biotina e HRP conjugado com avidina. Uma primeira incubação da amostra foi iniciada na placa durante 80 min a 37°C. De seguida, foi realizada a segunda incubação com o anticorpo conjugado com biotina durante 50 min a 37°C. A terceira incubação foi baseada numa solução de streptavidina conjugada com HRP, durante 50 min a 37°C. A quarta incubação foi baseada na solução de substrato, durante 20 min a 37°C no escuro. Depois de parar a reação com uma solução, foi realizada uma leitura da densidade ótica a 450 nm com recurso a leitor de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer).

3.7. Análise estatística

Para análise estatística, os resultados foram inicialmente agregados de acordo com as condições estudadas, isto é: Grupo Controlo (n= 40), Grupo irradiado com 10 mGy (n= 20) e Grupo irradiado

com 35 mGy (n= 20). Posteriormente, dividiram-se os dados em função das variáveis em estudo, nomeadamente o biomarcador a considerar e o tempo decorrido entre a irradiação e a análise. A análise estatística, assim como os gráficos foram feitos com o software GraphPad Prism 9, utilizando o teste ROUT com Q=5 de modo a remover possíveis valores discrepantes (outliers) e testes não paramétricos para avaliar significância estatística, como o teste de Kruskal-Wallis, utilizando um nível de significância de 95%, com valor de $p < 0.05$ na comparação dos resultados entre os grupos.

3.8. Aspectos éticos

Os procedimentos de uso, manipulação e sacrifício dos animais foram sempre selecionados no sentido de garantir o cumprimento dos mais elementares princípios éticos e de conforto animal, ao abrigo da legislação em vigor, nomeadamente o Decreto-Lei nº.111/2013 e a Diretiva 2010/63/EU, sendo exemplo disso a minimização do número de animais sacrificados, a escolha do método de eutanásia e as condições de manutenção dos animais no biotério, incluindo a supervisão por investigador com curso CAL-AQUA, de acordo com os critérios estabelecidos pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária e pela *Federation of European Laboratory Animal Science* (FELASA) para Cursos de Ciências em Animais de Laboratório – Categoria B.

4. Resultados

4.1. Manutenção e irradiação dos peixes

Durante a manutenção dos peixes, foram quantificadas de forma absoluta as variáveis temperatura e pH. Relativamente à temperatura, houve uma pequena oscilação nos primeiros dias, tendo estabilizado nos 27 graus nos restantes dias. Relativamente ao pH, este manteve-se entre 7.8 e 8.2, sendo que a maior oscilação foi sentida no último dia. Por questões de ordem logística, durante o fim de semana não foram realizados quaisquer registos (anexo 3). Durante a manutenção, ocorreu a perda de 2 peixes ainda em período de manutenção do modelo animal no sistema, pertencentes ao grupo de controlo. Não foi assinalada qualquer morte prematura após irradiação em todos os grupos e respetivos controlos.

4.2. Sacrifícios

Durante a fase de sacrifício, foram medidos os comprimentos longitudinais dos peixes, a massa do peixe inteiro, a massa do material biológico e caracterizado o seu sexo. Os peixes demonstraram uma massa média de $163,4 \pm 58.37$ mg de massa total, com um comprimento médio de $2,51 \pm 0.2837$ cm. A massa de material biológico foi um dos parâmetros mais variáveis, com a média de $18,45 \pm 8.14$ mg, com a massa mais baixa obtida de 6,7 mg, e a mais elevada de 41,0 mg. Os peixes eram maioritariamente fêmeas, com 54 dos 78 peixes ($\approx 70\%$), pelo que apenas 24 ($\approx 30\%$) eram machos. Todos os dados obtidos podem ser observados no anexo 4.

4.3. Análise da expressão de CRP

Na análise de CRP nos grupos de peixes sacrificados 1 dia após irradiação, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1– Resultados da análise de CRP e respetivos intervalos de valores 1 dia pós-irradiação

Dose (1 dia pós-irradiação)	Média \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Intervalo de valores ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Controlo	$0,013 \pm 0,0053$	0,006-0,023
10 mGy	$0,020 \pm 0,0144$	0,006-0,042
35 mGy	$0,081 \pm 0,0463$	0,039-0,178

Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e a dose 35 mGy ($p \leq 0,001$), sendo registado um aumento de CRP na ordem dos 543,1%; e entre as doses 10 mGy

e 35 mGy ($p \leq 0,01$), com uma diferença também estatisticamente significativa, verificando-se que o aumento induzido pela dose de 35 mGy é significativamente superior ao induzido pela dose de 10 mGy. Verificou-se também uma tendência para o aumento entre o controlo e a dose 10 mGy, de 60,3% (figura 12, gráficos A e B), mas sem significância estatística.

Na análise dos grupos de peixes sacrificados 7 dias após irradiação, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados da análise de CRP e respetivos intervalos de valores 7 dias pós-irradiação

Dose (7 dias pós-irradiação)	Média \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Intervalo de valores ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Controlo	0,042 \pm 0,0410	0,006-0,148
10 mGy	0,019 \pm 0,0098	0,007-0,033
35 mGy	0,130 \pm 0,0764	0,019-0,255

Destaque-se que se verificou um aumento significativo entre o grupo controlo e o grupo irradiado com dose de 35 mGy ($p \leq 0,01$), na ordem de 200,1%, e uma diferença estatisticamente significativa entre as doses 10 mGy e 35 mGy ($p \leq 0,01$). No entanto, foi detetada uma tendência para o decréscimo entre o controlo e a dose 10 mGy, na ordem de 49,3% (figura 12, gráficos C e B).

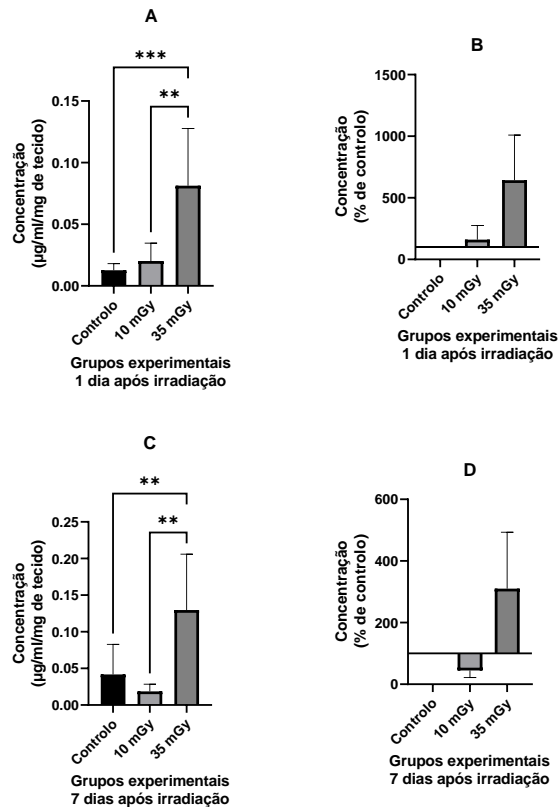


Figura 12– Resultado da quantificação de CRP dos grupos sacrificados 1 dia após irradiação (A) com respetiva comparação percentual (B) e dos grupos sacrificados 7 dia após irradiação (C) com respetiva comparação percentual (D). ***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$

4.4. Análise da expressão de IFN-gama

Na análise de IFN-gama nos grupos de sacrifício 1 dia pós irradiação (grupos 1 e 3), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3– Resultados da análise de IFN-gama e respetivos intervalos de valores 1 dia pós-irradiação

Dose (1 dia pós-irradiação)	Média \pm DP (pg.ml ⁻¹ .mg ⁻¹)	Intervalo de valores (pg.ml ⁻¹ .mg ⁻¹)
Controlo	3,593 \pm 2,6719	0,309-7,947
10 mGy	2,973 \pm 1,3127	1,843-5,820
35 mGy	1,234 \pm 0,8790	0,264-2,624

Não se verificaram quaisquer diferenças significativas entre os grupos. No entanto, notou-se uma tendência para o decréscimo nos dois grupos irradiados, com decréscimo de 17,2% na dose 10 mGy e 65,7% na dose de 35 mGy, quando comparados ao controlo (figura 13, gráfico A e B).

Na análise nos grupos de sacrifício 7 dias pós irradiação, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4- Resultados da análise de IFN-gama e respectivos intervalos de valores 7 dias pós-irradiação

Dose (7 dias pós-irradiação)	Média ± DP (pg.ml ⁻¹ .mg ⁻¹)	Intervalo de valores (pg.ml ⁻¹ .mg ⁻¹)
Controlo	1,569 ± 1,0934	0,319-3,577
10 mGy	0,615 ± 0,5423	0,049-1,578
35 mGy	0,821 ± 0,5185	0,059-1,882

Nesta análise foi detetado um decréscimo significativo no grupo irradiado com dose de 10 mGy ($P \leq 0.05$) de 60,8%, com uma tendência para o decréscimo no grupo irradiado com a dose de 35 mGy, na ordem de 47,7% (figura 13, gráfico C e D).

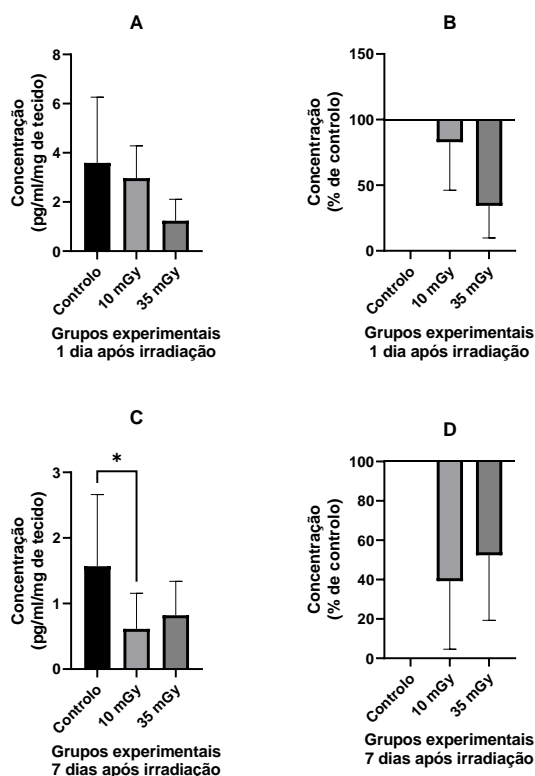


Figura 13- Resultado da quantificação de IFN-gama dos grupos sacrificados 1 dia após irradiação (A) com respetiva comparação percentual (B) e dos grupos sacrificados 7 dia após irradiação (C) com respetiva comparação percentual (D). *, $p \leq 0.05$

5. Discussão

A CRP é uma proteína de fase aguda que demonstra aumentos pronunciados na concentração plasmática na resposta a infecção ou lesão tecidual, sendo por isso um marcador extremamente útil para a detecção de inflamação (44). A radiação ionizante tem o poder de modular o sistema imune através da interação com moléculas e/ou proteínas, alterando ou limitando o funcionamento celular, como mencionado anteriormente. Como tal, seria de esperar que a irradiação tivesse algum efeito na expressão de CRP. Num estudo realizado por Ossetrova, Sandgren et al. (45) foi demonstrado que existe uma expressão inicial de CRP após irradiação com doses de 1 Gy ou mais, demonstrando que existe uma relação entre irradiação e expressão de CRP.

No peixe zebra, a CRP tem uma estrutura muito semelhante à humana, assim como o sistema de indução, em ambos a envolver TLRs e citocinas pró-inflamatórias. Num estudo realizado por Lin, Chen et al. (46), foi demonstrado que proteínas de resposta de fase aguda, como a CRP, demonstram comportamentos semelhantes a outras proteínas homólogas nos mamíferos, que parece ser confirmado num estudo de Sun, Li et al. (47) onde após estimulação de embriões de peixe zebra com LPS, se verificaram aumentos significativos na expressão de genes de proteínas de resposta de fase aguda, como de CRP. Noutro estudo, realizado por Saralahti, Harjula et al. (48), após indução de processos inflamatórios, foi demonstrado um papel conservado na resposta imune inata dos peixes zebra.

Sendo que a CRP é um indicador da presença de inflamação, o aumento significativo após irradiação com dose de 35 mGy, quer seja 1 ou 7 dias após irradiação, sugere que a irradiação com essa dose é suficiente para induzir inflamação. Um padrão distinto pode ser observado nas doses de 10 mGy, tanto 1 dia como 7 dias após irradiação, verificando-se uma tendência, estatisticamente significativa, para o aumento no primeiro momento e uma tendência de decréscimo na fase mais tardia, o que sugere que 10 mGy não terá sido suficiente para induzir processos inflamatórios significativos e prolongados no tempo.

IFN-gama é uma citocina primariamente secretada por células T e células NK ativadas, que promove respostas pró-inflamatórias, como ativação de macrófagos, mediação da atividade antibacteriana e antiviral, entre outros (49, 50). O peixe zebra tem no seu genoma 2 genes que são semelhantes ao IFN-gama de mamíferos, denominados de IFN-gama1 e IFN-gama2. De acordo com o estudo feito por Sieger, Stein et al. (51) em peixes zebra, os resultados sugerem que

tanto IFN-gama1 e IFN-gama2 são funcionalmente equivalentes ao IFN-gama de mamíferos, o que permite que o peixe zebra seja um modelo coerente para a detecção de IFN-gama.

Os resultados de IFN-gama parecem ir contra o observado no artigo de revisão mencionado anteriormente, sendo que, tanto 1 dia como 7 dias após irradiação com 10 mGy e 35 mGy, foram demonstradas tendências para o decréscimo de IFN-gama, sendo que nos 7 dias após irradiação com 10 mGy foi verificada uma diferença estatisticamente significativa. No estudo feito por Bogdandi, Balogh et al. (52), no qual fizeram uma análise a este biomarcador, foram obtidos resultados semelhantes aos nossos, no entanto, a alteração significativa verificada ocorreu em momentos diferentes, com decréscimo significativo verificado ao primeiro dia pós irradiação. Porém, foram o único estudo a demonstrar uma tendência semelhante, sendo que os outros demonstraram uma tendência inversa, isto é, aumento da expressão de IFN-gama.

Uma possível razão para os resultados será a metodologia de irradiação adotada. Neste estudo, a fonte utilizada permitiu irradiações com taxa de dose aproximadamente igual a 0,044 mGy/min, enquanto noutros estudos foram utilizadas fontes que levaram a taxas de dose mais elevadas, com irradiações muito mais agudas, como Zhou, Zhang et al. (53), que utilizaram uma fonte com irradiação de 12.5 mGy/min, ou Cho, Kang et al. (54), com irradiação de 204 mGy/min. Em ambos os casos citados foram demonstrados aumentos da expressão de IFN-gama com irradiações agudas na mesma dose. Uma vez que não existe nenhuma definição concreta de um limite entre dose aguda e dose crónica, a metodologia de irradiação adotada neste estudo poderá eventualmente ser considerada como crónica, uma vez que os peixes foram irradiados ao longo de 3h47min para a dose de 10 mGy, e 13h16min para a dose de 35 mGy, resultando numa taxa de dose durante a irradiação muito inferior às verificadas noutros estudos de irradiação aguda. Isto parece fazer sentido, uma vez que, no artigo de revisão previamente elaborado, foi observada uma resposta anti-inflamatória após irradiação crónica. Esta resposta anti-inflamatória será indicada pelo decréscimo dos níveis de IFN-gama, uma vez que esta citocina é pró-inflamatória, fazendo parte de um processo antagónico.

É de realçar que, neste trabalho experimental, foram utilizadas amostras do baço e do trato gastrointestinal, nomeadamente o fígado, o intestino e a vesícula biliar. Para IFN-gama, existem estudos que utilizaram amostras do trato gastrointestinal para quantificar os níveis deste parâmetro, como Barbaro, Di Sabatino et al. (55), e amostras de baço, como Kubota and Kadoya (56), sendo por isso uma amostra de tecido viável para utilizar neste tipo de estudo. Relativamente a CRP, o método comum para quantificar esta proteína centra-se em amostras

sanguíneas. No entanto, no caso do peixe zebra, devido às suas dimensões, a recolha de sangue torna-se tecnicamente complexa, e o volume obtido poderá não ser suficiente para análise indicada. Porém, como CRP é uma proteína produzida no fígado, e que surge aumentada em locais de inflamação, a utilização destes tecidos poderá considerar-se igualmente pertinente (57). Quando a medição é feita com um órgão, os níveis de CRP serão indicadores de inflamação local, e não sistémica. Por isso, dado que foram utilizados vários órgãos, incluindo o fígado, produtor de CRP e altamente vascularizado, assume-se possível fazer uma maior aproximação a uma análise de inflamação sistémica, mesmo que esse impacto possa estar algo subestimado neste trabalho.

Denote-se, por fim, que o peixe zebra foi selecionado por ser um modelo atraente para o estudo do sistema imune, uma vez que é de fácil manutenção e demonstra alta conservação de diversos componentes e mecanismos relativos ao sistema imune, como é o caso de CRP e IFN-gama.

Os testes ELISA são muito utilizados na quantificação tanto de CRP (58-60), como de IFN (61-63). Como tal, assumiu-se neste trabalho que ELISA é um método adequado para o estudo destes parâmetros. Dos kits utilizados, o kit de deteção de IFN-gama é específico para peixes zebra, sendo por isso especializado e indicado para a deteção de IFN-gama em peixes zebra. O kit de deteção CRP não é tão específico, sendo próprio para vários tipos de peixes. Porém, uma vez que os parâmetros a analisar estão bem conservados entre peixes teleósteos (64), este teste é competente na deteção de CRP em peixes zebra.

Os testes ELISA têm algumas limitações, como alta possibilidade de falsos positivos/negativos ou instabilidade de anticorpos, mas a alta especificidade e sensibilidade, alta eficiência e a simplicidade do procedimento tornam este método o indicado para a medição destes parâmetros (65). Nesse sentido, ainda que este trabalho tenha um carácter maioritariamente exploratório, poderá assumir-se que a metodologia de análise dos biomarcadores selecionados se considera válida para o modelo biológico usado, salvaguardando a validade dos dados obtidos.

Relativamente aos resultados obtidos a partir de ELISA, deve se referir que se registou uma variabilidade considerável (ilustrada pelo elevado desvio padrão dos resultados obtidos), que certamente se relaciona com o reduzido tamanho amostral, mas também com alguma variabilidade associada ao ensaio e ao método de colheita das amostras de tecido para análise. Acresce ainda referir que os dados foram normalizados para a massa total de tecido biológico, ao invés da massa de proteína recolhida, que poderia eventualmente reduzir essa variabilidade.

Porém, não se acredita ser suficiente para provocar alterações significativas nas tendências globais observadas neste trabalho.

A irradiação dos peixes representou um desafio, uma vez que existiram diversas variáveis a ponderar previamente ao estabelecimento de um protocolo de irradiação. Em primeiro lugar, a irradiação em água contribui para uma variável significativa para a quantificação da dose de irradiação, dado que alguma da radiação pode ser absorvida/atenuada por moléculas de água, reduzindo a dose de radiação que chegará aos peixes (1). Numa situação em que são administradas doses elevadas de forma aguda, os efeitos desta situação deverão ser negligenciáveis. No entanto, em situações como a presente, a água pode atuar como um atenuante relevante, reduzindo a dose absorvida pelo peixe, que no caso do estudo doses baixas, poderá ser significativa. Para reduzir este efeito, o volume de água utilizado foi mínimo, de modo a reduzir ao máximo a influencia deste fator, mantendo ainda as condições necessárias para a sobrevivência dos peixes – que foi previamente testada e otimizada (em experiências empíricas não relatadas/publicadas).

Outro desafio encontrado, também relacionado com a água, foi a movimentação natural dos peixes. O volume de água foi utilizado também para limitar esta variável. Neste sentido, é importante denotar que a quantificação absoluta da dose de radiação absorvida pelos peixes pode incluir algum grau de incerteza, assumindo-se, no entanto, que este fator será sempre no sentido da sobrestimação da dose (*worst-case scenario*), mantendo-se sempre o fator de triplo entre as duas doses testadas.

Outro desafio para a irradiação dos peixes terá sido a fonte utilizada. Uma vez que a dose de irradiação induzida pela fonte foi conseguida com recurso a uma reduzida taxa de dose, o que implicou que os peixes tivessem de ficar nos aquários durante longos períodos, sem reposição de água, o que teve igualmente de ser ponderado e cuidadosamente testado para evitar impactos na saúde dos peixes. Para reduzir a influência desta variável nos resultados obtidos, o grupo de controlo foi submetido às mesmas condições de irradiação, excetuando-se, obviamente, a exposição à fonte de radiação.

O objetivo desta dissertação era testar os efeitos de uma irradiação aguda de LDIR. No entanto, a taxa de dose durante a irradiação com a fonte, por ser muito reduzida, levou a uma irradiação mais prolongada, permitindo que o organismo se adaptasse, eventualmente, e corrigisse alguns dos danos provocados pela irradiação. No entanto, com base nos resultados apresentados, fará

sentido apreciar os efeitos provocados num ponto de vista de irradiação crónica, isto é, com reduzida taxa de dose, ao longo de um período de tempo não negligenciável.

O conhecimento sobre os efeitos de LDIR no sistema imune é muito escasso, e aquele que existe é controverso e não consensual. Como tal, no futuro, devem ser feitos esforços para replicar resultados utilizando uma definição de LDIR consensual, de modo a consolidar o conhecimento já existente. Por outro lado, mais estudos devem ser feitos em parâmetros não analisados, de modo a estabelecer qual o mecanismo das interações entre LDIR, aguda ou crónica, e o sistema imune (exemplo: expressão de outras citocinas, expressão de recetores importantes para processos imunes, quantificação de células e sua diferenciação...).

O futuro da utilização do peixe zebra como modelo passa pela otimização de protocolos de irradiação; estabelecimento de uma metodologia de análise fiável e reproduzível; e realização de estudos comparativos, de modo a estabelecer o peixe zebra como modelo de estudo dos efeitos de LDIR no sistema imune.

6. Conclusão

Do ponto de vista teórico, concluiu-se que a resposta do sistema imune está dependente do método de irradiação e das suas condições. Quando a irradiação com LDIR é implementada de forma aguda, demonstrou induzir uma resposta pró-inflamatória no sistema imune, e quando a irradiação com LDIR foi implementada de forma crónica, demonstrou o inverso, com uma reação anti-inflamatória do sistema imune.

Em termos experimentais, a análise dos níveis de CRP um dia após irradiação demonstrou aumentos da sua expressão, tanto após irradiação com a dose absorvida de 10 mGy, embora não significativos do ponto de vista estatístico, como com a dose absorvida de 35 mGy, com aumentos estatisticamente significativos, sugerindo que existe uma resposta inflamatória inicial, muito mais intensa na dose mais elevada.

Ao sétimo dia, a resposta inflamatória resultante da dose de 10 mGy parece estar resolvida, havendo uma tendência para a redução, quando comparado com o controlo. No entanto, para a dose de 35 mGy, os valores mantêm-se aumentados significativamente, o que pode sustentar que os processos inflamatórios se mantêm ao longo do tempo.

A análise dos níveis de IFN-gama ao primeiro dia demonstrou reduções não significativas nas duas doses, de maior dimensão na dose de 35 mGy, o que parece indicar a indução de uma resposta anti-inflamatória, de modo a combater a inflamação inicial mencionada anteriormente. Ao sétimo dia, a redução mantêm-se, tornando-se estatisticamente significativa na dose mais reduzida, o que, quando aliado ao resultado de CRP, aparenta indicar que o efeito anti-inflamatório induzido pela dose de 10 mGy será suficiente para combater a resposta inflamatória observada no primeiro dia. Para a dose superior, parece também haver indução de um efeito anti-inflamatório, porém, este parece ser insuficiente, ou mais lento no controlo da inflamação verificada no primeiro dia, uma vez que o aumento significativo de CRP se manteve ao sétimo dia. Os resultados evidenciados parecem indicar que as doses absorvidas de 10 e 35 mGy, com irradiação a baixa taxa de dose, induzem processos inflamatórios proporcionais à dose de irradiação e, em concordância com o artigo de revisão, um efeito anti-inflamatório que se mantêm ao sétimo dia, sendo eficaz na redução dos processos inflamatórios iniciais para a dose mais reduzida. Estes dados sublinham a relevância da taxa de dose de irradiação com LDIR na resposta imune induzida.

Esta dissertação poderá, assim, servir como base preliminar de fundação para outros estudos com peixe zebra sobre os efeitos do sistema imune, permitindo contribuir para a validação de alguns desenhos experimentais, mas também contribuir para a criação de algum conhecimento de base ainda em falta, especificamente no que diz respeito à expressão de CRP e IFN- γ e à sua interligação com LDIR. Este projeto demonstrou o potencial da utilização do peixe zebra para o estudo de LDIR e, com este modelo, existem diversas possibilidades de estudo, como a otimização do procedimento utilizado, utilização de outras formas de irradiação, estudo de outros parâmetros/indicadores, entre outros, que permitam clarificar uma área cujo conhecimento é ainda reduzido e muito controverso.

Resumindo, conseguiu-se atingir o principal objetivo deste trabalho. Face aos resultados obtidos, tendo em conta que o estudo implementado tem carácter exploratório, foi criado o início de uma base para o estudo dos efeitos de LDIR no sistema imune, através da recolha, exposição e interpretação dos dados obtidos de vários outros estudos, e o início de uma base para a utilização do peixe zebra no estudo destes efeitos, demonstrando resultados concordantes com o observado na revisão bibliográfica.

7. Referências Bibliográficas

1. Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students: International Atomic Energy Agency; 2010.
2. Reed AB. The history of radiation use in medicine. *Journal of Vascular Surgery*. 2011;53(1):3S-5S.
3. Nobel Lectures in Physics: World Scientific Publishing Company; 1998.
4. Bolus NE. Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*. 2017;45(4):259-64.
5. Mettler FAG, Milton J.. *Essentials of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 7th ed 2019.
6. Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly and Scientific Annexes A and B. UNSCEAR 2012 Report. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation; 2015.
7. Joshi GS, Joiner MC, Tucker JD. Cytogenetic characterization of low-dose hyper-radiosensitivity in Cobalt-60 irradiated human lymphoblastoid cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014;770:69-78.
8. Antonelli F, Campa A, Esposito G, Giardullo P, Belli M, Dini V, et al. Induction and Repair of DNA DSB as Revealed by H2AX Phosphorylation Foci in Human Fibroblasts Exposed to Low- and High-LET Radiation: Relationship with Early and Delayed Reproductive Cell Death. *Radiation Research*. 2015;183(4):417-31.
9. Cervelli T, Panetta D, Navarra T, Andreassi MG, Basta G, Galli A, et al. Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2014;235:510-8.
10. Tewari S, Husain N, Rastogi M, Mishra S, Srivastava AK, Khan K. Peripheral Blood Lymphocytes as In Vitro Model to Evaluate Genomic Instability Caused by Low Dose Radiation. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2016;Volume 17:1773-7.
11. Amundson SD, KT; Fornace, AJ Jr. Induction of stress genes by low doses of gamma rays. *Radiat Res*. 1999.
12. Rothkamm K, Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(9):5057-62.
13. Liang-Hao D, Masato S, Fanqing C, Jeng-Jong H, Sandeep B, Clarissa L, et al. Gene Expression Profiles of Normal Human Fibroblasts after Exposure to Ionizing Radiation: A Comparative Study of Low and High Doses. *Radiation Research*. 2005;164(1):17-26.
14. Wilson KD, Sun N, Huang M, Zhang WY, Lee AS, Li Z, et al. Effects of Ionizing Radiation on Self-Renewal and Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells. *Cancer Research*. 2010;70(13):5539-48.
15. Abbas AL, Andrew; Pillai, Shiv *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 6th ed: Elsevier; 2019.
16. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015;517(7534):293-301.
17. Greten FR, Grivnickov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27-41.
18. Spiering MJ. Primer on the Immune System. *Alcohol Res*. 2015;37(2):171-5.
19. Thimmappa PY, Vasishta S, Ganesh K, Nair AS, Joshi MB. Neutrophil (dys)function due to altered immuno-metabolic axis in type 2 diabetes: implications in combating infections. *Human Cell*. 2023.
20. Grisar-Tal S, Itan M, Klion AD, Munitz A. A new dawn for eosinophils in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(10):594-607.

21. Kuruvilla ME, Lee FE-H, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2019;56(2):219-33.
22. Germic N, Frangez Z, Yousefi S, Simon HU. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death and Differentiation*. 2019;26(4):715-27.
23. Kordon AO, Pinchuk L, Karsi A. Adaptive Immune System in Fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2022;22(4).
24. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):6008.
25. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(2):95-112.
26. Doherty DG, Melo AM, Moreno-Olivera A, Solomos AC. Activation and Regulation of B Cell Responses by Invariant Natural Killer T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
27. Nasiadka A, Clark MD. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR Journal*. 2012;53(2):161-8.
28. Esmail MY, Astrofsky KM, Lawrence C, Serluca FC. Chapter 20 - The Biology and Management of the Zebrafish. In: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, editors. *Laboratory Animal Medicine (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. p. 1015-62.
29. Luzio A, Matos M, Santos D, Fontáinhas-Fernandes AA, Monteiro SM, Coimbra AM. Disruption of apoptosis pathways involved in zebrafish gonad differentiation by 17 α -ethinylestradiol and fadrozole exposures. *Aquat Toxicol*. 2016;177:269-84.
30. Abozaid H, Wessels S, Horstgen-Schwark G. Effect of Rearing Temperatures during Embryonic Development on the Phenotypic Sex in Zebrafish (*Danio rerio*). *Sexual Development*. 2011;5(5):259-65.
31. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*. 1981;291(5813):293-6.
32. Walker C, Streisinger G. Induction of Mutations by γ -rays in Pregonial Germ Cells Of Zebrafish Embryos. *Genetics*. 1983;103(1):125-36.
33. Jao L-E, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(34):13904-9.
34. Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(14):e141-e.
35. Choi T-Y, Choi T-I, Lee Y-R, Choe S-K, Kim C-H. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine*. 2021;53(3):310-7.
36. Rauta PR, Nayak B, Das S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol Lett*. 2012;148(1):23-33.
37. Campos-Sánchez JC, Esteban MÁ. Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model. *Journal of Fish Diseases*. 2021;44(2):123-39.
38. Meeker ND, Trede NS. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol*. 2008;32(7):745-57.
39. Da'as S, Teh EM, Dobson JT, Nasrallah GK, McBride ER, Wang H, et al. Zebrafish mast cells possess an Fc ϵ RI-like receptor and participate in innate and adaptive immune responses. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011;35(1):125-34.
40. Megarani DV, Hardian AB, Arifianto D, Santosa CM, Salasia SIO. Comparative Morphology and Morphometry of Blood Cells in Zebrafish (*Danio rerio*), Common Carp (*Cyprinus carpio carpio*), and Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2020;59(6):673-80.

41. Key B, Arlinghaus R, Browman HI, Cooke SJ, Cowx IG, Diggles BK, et al. Problems with equating thermal preference with 'emotional fever' and sentience: comment on 'Fish can show emotional fever: stress-induced hyperthermia in zebrafish'; by Rey et al. (2015). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2017;284(1847):20160681.
42. Gomes AR, Abrantes AM, Brito AF, Laranjo M, Casalta-Lopes JE, Gonçalves AC, et al. Influence of P53 on the radiotherapy response of hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol*. 2015;21(3):257-67.
43. Gupta T, Mullins MC. Dissection of organs from the adult zebrafish. *J Vis Exp*. 2010(37).
44. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular Immunology*. 2001;38(2-3):189-97.
45. Ossetrova NI, Sandgren DJ, Blakely WF. C-reactive protein and serum amyloid A as early-phase and prognostic indicators of acute radiation exposure in nonhuman primate total-body irradiation model. *Radiation Measurements*. 2011;46(9):1019-24.
46. Lin B, Chen SW, Cao Z, Lin YQ, Mo DZ, Zhang HB, et al. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals. *Molecular Immunology*. 2007;44(4):295-301.
47. Sun WW, Li ZY, Zhang SC. Acute phase response in zebrafish embryo/larva with special emphasis on LPS-induced changes in expression pattern of acute phase protein genes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2014;94(7):1569-80.
48. Saralahti AK, Harjula SKE, Rantapero T, Uusi-Makela MIE, Kaasinen M, Junno M, et al. Characterization of the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* infection in zebrafish. *Plos Genetics*. 2023;19(1).
49. Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy*. 1999;54(12):1233-51.
50. Ivashkiv LB. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(9):545-58.
51. Sieger D, Stein C, Neifer D, van der Sar AM, Leptin M. The role of gamma interferon in innate immunity in the zebrafish embryo. *Disease Models & Mechanisms*. 2009;2(11-12):571-81.
52. Bogdandi EN, Balogh A, Felgyinszki N, Szatmari T, Persa E, Hildebrandt G, et al. Effects of Low-Dose Radiation on the Immune System of Mice after Total-Body Irradiation. *Radiation Research*. 2010;174(4):480-9.
53. Zhou L, Zhang XY, Li H, Niu C, Yu DH, Yang GZ, et al. Validating the pivotal role of the immune system in low-dose radiation-induced tumor inhibition in Lewis lung cancer-bearing mice. *Cancer Medicine*. 2018;7(4):1338-48.
54. Cho SJ, Kang H, Hong EH, Kim JY, Nam SY. Transcriptome analysis of low-dose ionizing radiation-impacted genes in CD4(+) T-cells undergoing activation and regulation of their expression of select cytokines. *Journal of Immunotoxicology*. 2019;15(1):137-46.
55. Barbaro MR, Di Sabatino A, Cremon C, Giuffrida P, Fiorentino M, Altimari A, et al. Interferon- γ is increased in the gut of patients with irritable bowel syndrome and modulates serotonin metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310(6):G439-47.
56. Kubota K, Kadoya Y. Innate IFN- γ -producing cells in the spleen of mice early after *Listeria monocytogenes* infection: importance of microenvironment of the cells involved in the production of innate IFN- γ . *Front Immunol*. 2011;2:26.
57. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. 2018;9:754.
58. Sun BQ, Feng Y, Mo XN, Zheng PY, Wang Q, Li PC, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):940-8.

59. Williams RD, Moran JA, Fryer AA, Littlejohn JR, Williams HM, Greenhough TJ, et al. Monomeric C-Reactive Protein in Serum With Markedly Elevated CRP Levels Shares Common Calcium-Dependent Ligand Binding Properties With an in vitro Dissociated Form of C-Reactive Protein. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
60. Saleem M, Iftikhar A, Asif M, Hussain K, Alamgeer, Shah PA, et al. Asphodelus tenuifolius extracts arrested inflammation and arthritis through modulation of TNF-alpha, NF-kappa B, ILs, and COX-2 activities in in vivo models. *Inflammopharmacology*. 2021;29(2):483-97.
61. Ghazavi A, Ganji A, Keshavarzian N, Rabiemajd S, Mosayebi G. Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. *Cytokine*. 2021;137.
62. Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Fard SN, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(2).
63. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, Schiuma G, Beltrami S, Strazzabosco G, et al. TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-CoV-2 Infection. *Microorganisms*. 2021;9(9).
64. Bello-Perez M, Falco A, Medina-Gali R, Pereiro P, Encinar JA, Novoa B, et al. Neutralization of viral infectivity by zebrafish c-reactive protein isoforms. *Molecular Immunology*. 2017;91:145-55.
65. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*. 2018;72(1):32-42.

8. Anexos

Low Dose Ionizing Radiation (LDIR) and the immune system: a review

Ricardo Dinis Azevedo Martins^a, Ricardo Ferraz^b, Pedro Costa^c

^aCISA, School of Health, Porto Polytechnic Institute, Porto, Portugal; ^bDepartment, University, City, Country

Low Dose Ionizing Radiation (LDIR) and the immune system: a review

Background: Ionizing radiation (IR) is unavoidable in medicine, whether it's in cancer treatment, through radiotherapy with high doses, or in imaging with low doses. While the effects of high-dose ionizing radiation (HDIR) are well known, low-dose effects are still shrouded in controversy. IR will act on cells either directly, altering DNA and protein structure, or through the creation of free radicals, affecting a cell's functionality and ultimately, viability (Rothkamm and Löbrich 2003). This will affect the immune system, as IR not only induces an immune response but also targets immune cells which according to the law of Bergonie and Tribondeau, are radiosensitive. While not consensual, it is theorized that IR might have a hormesis effect (Bolus 2017). LDIR has been defined in 2012 as any dose lower than 100 mGy. Despite this, multiple articles have different definitions of LDIR, so knowledge about the effects might be somewhat skewed (Joshi et al. 2014; Antonelli et al. 2015).

Objective: Through article and data analysis, we aimed to assess the knowledge of LDIR effects on the immune system and present a possible mechanism for their interaction.

Methods: A literature review using a combination of keywords with Boolean search terms on the search engine of Web of Science™ was implemented, with 100 articles selected and after filtering through inclusion criteria, the remaining 45 articles had their data collected and compiled.

Results: LDIR showed activation of pathways that induce immune activity. Acute LDIR was shown to increase pro-inflammatory and decrease anti-inflammatory cytokine production, macrophage, and natural killer cells' proliferation and activity while harming splenocyte and T cell counts. Chronic LDIR showed reverse effects on cytokines, combined with reduced enzymes responsible for antioxidant defenses.

Conclusions: Results seem to show that acute LDIR induces a pro-inflammatory response and has anti-tumoral activity, whereas chronic LDIR has anti-inflammatory properties.

Keywords: radiobiology; immune system; low-dose ionizing radiation

Introduction

Nowadays, ionizing radiation is necessary in medicine. The use of ionizing radiation in imaging is common, it could be x-rays in a Computerized Tomography (CT) scan or gamma rays in Nuclear Medicine. These are two of the most common ways ionizing radiation is used in medicine. Recent studies have been made to understand how these procedures, using ionizing radiation in relatively low doses, could impact different parts of the human organism, especially the immune system.

The Immune System

The immune system is a complex network of biological structures whose function is to maintain the organism healthy. The immune system can detect infectious agents (viruses, bacteria, fungi, etc.) or damaged/abnormal cells, distinguishing them from healthy cells of the organism, eliminating the threat, and initiating repair and remodeling processes, to maintain tissue homeostasis. The immune system is divided into two major mechanisms: the innate immune system (IIS) and the adaptive or acquired immune system (AIS) (Rauta et al. 2012; Artis and Spits 2015).

The organism's defenses frontline is the IIS, which is tasked with recognizing the products of infection and injury (antigen), and their elimination. It is composed of chemical and physical barriers, like the skin, leucocytes, and the complement system. The responses of the IIS to infection, whether acute or chronic/persistent or an injury, are usually manifested through inflammation. Its purpose is to contain the infection, increase the accessibility of immune cells and proteins to the lesion site, and promote healing once the pathogen has been eliminated (Spiering 2015). If the IIS cannot

eliminate the source of injury by itself, it will promote the activation of the AIS (Kordon et al. 2022).

The AIS, after antigen recognition, eliminates the pathogens responsible and generates immunological memory (Akira et al. 2006). It is composed mainly of B cells and T cells. These cells have antigen-specific receptors, such as T-cell receptors and B-cell receptors, that allow the recognition and elimination of pathogens. This system is also responsible for the protection of recurrent infections by generating memory cells that provide long-term specific immunity (Kordon et al. 2022).

Cytokines are small proteins that play a vital part in both IIS and AIS, contributing to immune function, cell damage, inflammation, and many other immune system activities (Morris et al. 2022).

When cells are injured by, for example, radiation, they release chemicals that trigger inflammatory, vascular, and immune responses. Radiation mainly targets DNA, leading to cell death, carcinogenesis, and mutation resulting from DNA breaks. These cells can be eliminated by IIS or AIS. While the IIS acts, NK cells can eliminate these cells, which are recognized and, once activated, they release proteins that enter damaged cells and activate enzymes, inducing apoptosis (Abbas 2019). Otherwise, damaged cells release molecules, known as damage-associated molecular patterns (DAMPs). These are recognized by dendritic cells, which then serve as a bridge between IIS and AIS, presenting them to immature T cells, and inducing their differentiation and activation. These will either induce repair mechanisms on the damaged cells or apoptosis mechanisms, similar to NK cells (Rock et al. 2011).

Basics of radiation biology

The first reported knowledge of ionizing radiation dates to 1895 when Roentgen discovered x-rays, and soon after, Henri Becquerel discovered another type of rays,

which he called natural phosphorescence or radioactivity, from uranium. Following this discovery, Marie and Pierre Curie found different sources, like polonium and radium. (Reed 2011). After these discoveries, many scientists believed that radioactivity exposure could only be positive, being used in treatments, but this could not be further from the truth. Pierre Curie was the first to report radiation disease, stating:

‘(...) If one leaves a wooden or cardboard box containing a small glass ampulla with several centigrams of salt in one’s pocket for a few hours, one will feel absolutely nothing. But 15 days afterward, a redness will appear on the epidermis, and then a sore which will be very difficult to heal (...)’ (Nobel Lectures in Physics 1998).

Nowadays, radiation disease is one of the most diseases studied. With the study of Radiation Biology or radiobiology, a lot is known about the mechanisms of radiation at the cellular, tissue, organ, or system level. Nevertheless, not all is understood, in comparison to other agents used in medicine (Reed 2011).

Basic concepts of radiation biology include the law of Bergonie and Tribondeau, which states that cells that are immature, undifferentiated, and actively undergoing mitosis, like stem cells, are more susceptible to radiation (radiosensitive) than cells that are mature, differentiated, and not actively dividing, like neurons, which are called radioresistant (Haber and Rothstein 1969). The interaction of radiation with cells is not absolute. Because cells can undergo cellular repair, which means that interaction between them may not result in permanent damage. There is no unique cellular damage known associated with radiation. Any damage caused by radiation exposure can be caused in other ways, like thermal, chemical, or physical damage. (Bolus 2017). Radiation can be classified into two main categories, ionizing and non-ionizing.

Ionizing radiation (IR) can have two distinct types of interactions with a cell: direct or indirect interaction. Direct interaction happens when radiation interacts with

the critical target of the cell, whether it is DNA or a protein, directly affecting the functionality and viability of a cell. Indirect interaction happens when radiation and other molecules and atoms interact within the cell, forming free radicals, like $\text{H}_2\text{O}^+\bullet$ (water ion) or $\text{OH}\bullet$ (hydroxyl radical), which in turn break chemical bonds in other parts of the cell, leading to biological damage (Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students 2003). There are 3 ways that cellular injury can occur after IR exposure: division delay: 1) reproductive failure immediately, 2) reproductive failure after some generations, and 3) interphase death. The last one can happen several generations after exposure, is most common in lymphocytes, and happens through apoptosis (Bolus 2017).

Damage can be stochastic or deterministic. Stochastic effects are random in nature, which means that there is a probability of happening, and occurrence increases with the dosage received, but the severity does not depend on the dose. This type of damage does not have a threshold, meaning it can happen at any dose. A deterministic effect usually happens above a certain threshold, with bigger doses resulting in increasing severity, and its symptoms are predictable. (Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students 2003)

There are three different radiation measurement units: 1) Becquerel (Bq) is the SI unit for radioactivity, with the old unit being Curie (Ci), 2) Gray (Gy) is the SI unit for absorbed dose and rad is the old unit and 3) Sievert (Sv) is the SI unit for effective or equivalent dose and rem is the old unit.

High-dose Ionizing Radiation vs Low dose Ionizing Radiation

In 2012, the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) defined low dose (LDIR) as 100 mGv or less. Despite this, there is still controversy about the definition of LDIR, as there are multiple articles available from

2012, which use different measures for LDIR. Some examples include Joshi et al. (2014), defining LDIR as <200 mGy; Antonelli et al. (2015) and Cervelli et al. (2014), with LDIR as <0.5 Gy, and Tewari et al. (2016), which has LDIR as <1 Gy. Adding to these examples other articles from before 2012 with different definitions (Amundson 1999; Rothkamm and Löbrich 2003; Liang-Hao et al. 2005; Wilson et al. 2010), knowledge about LDIR effects might be skewed by these contradictions.

On the other hand, knowledge about the effects of high-dose IR (HDIR) is well documented. Due to a focus on the study of cancer radiotherapy, and big incidents related to radiation, like the bombing of Hiroshima and Nagasaki in 1945, and the nuclear accident in Chernobyl in 1986. The availability of data, the urgency of these situations, and the general population's concern regarding these events lead to an increased effort into documenting the effects of HDIR.

There are many theories about possible different types of dose-response models to explain all the different effects of radiation exposure. They are the Linear No-Threshold model, which states that any dose of radiation can cause effects; the Linear Threshold model, which states that there's a known threshold below which no effects are seen; and the Linear Quadratic model, where there is no threshold, response to LDIR is linear and to HDIR is quadratic. There is also a fourth model that supports the idea that low-level exposure to ionizing radiation might have a hormetic effect, called the Radiation Hormesis model, which suggests that the nature of radiation's dose response might be biphasic (Volkova et al. 2022). Despite there being contradictions to the usage of these models, while the Linear Threshold model might make more sense to use, the Linear Quadratic model is used for overall human response, and best explains the reaction of human cells to IR exposure (Bolus 2017).

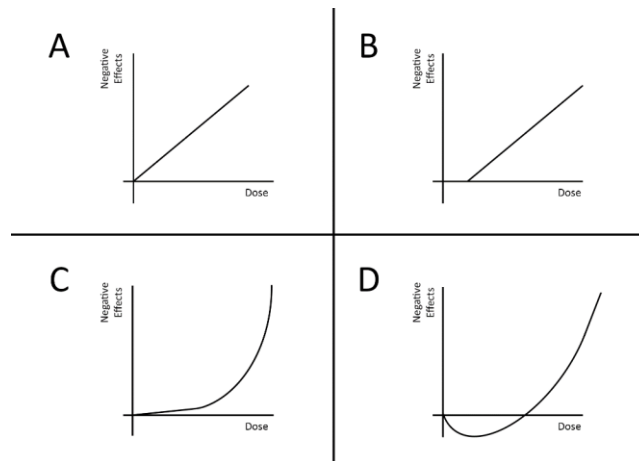


Figure 1: Different dose-response curves for the Linear No-Threshold model (A), Linear Threshold model (B), Linear Quadratic model (C), and Radiation Hormesis model (D)

In this article, we aim to review and assess the knowledge of LDIR effects on the immune system and present a possible mechanism for their interaction.

Methods

To demonstrate the discrepancy between LDIR research and general radiation research related to the IS, we searched for available articles using the search engine on Web of Science™, on all databases. To include as many articles as possible, while excluding those that aren't related to the topics intended, we used the following Boolean search terms:

- IS and radiation research articles:
 - (TS= (“Immune system”) OR TS=(“immunity”) OR TS=(“immune cells”) OR TS=(“immune cell”)) AND (TS=(“ionizing radiation”) OR TS=(radiation biology))
- IS and radiation research articles:
 - ((TS= (“Immune system”) OR TS=(“immunity”)) AND (TS=(ionizing radiation) OR TS=(radiation biology))) AND (TS=(“low dose radiation”) OR TS=(“low dose ionizing radiation”))

In both cases, we exclusively include articles related to scientific/experimental research, not reviews.

For the literature analysis, using the same search terms mentioned before, 100 articles were selected. After selection, those that were deemed “non-related”, were removed from the group of articles present in this review. The reasons for removal will be provided along with the related statistics. Data from the articles were collected, and all variations were compiled, to establish a possible theory for the effects of LDIR on the IS.

Search results

We have found differences between IS-IR and IS-LDIR research. While the oldest IS-radiation article found dates from 1927, it was only 53 years later that the first article mentioning LDIR was found, in 1980. Overall, search results showed 133.839 articles related to IS-IR, while only 572 articles related to IS-LDIR, which means that there are 233x more IS-IR than IS-LDIR articles. And, in addition, most IS-LDIR articles dated before 2012 might not use the current definition of LDIR, meaning that the number is, most likely, estimated by excess. This data is represented in Figure 1.

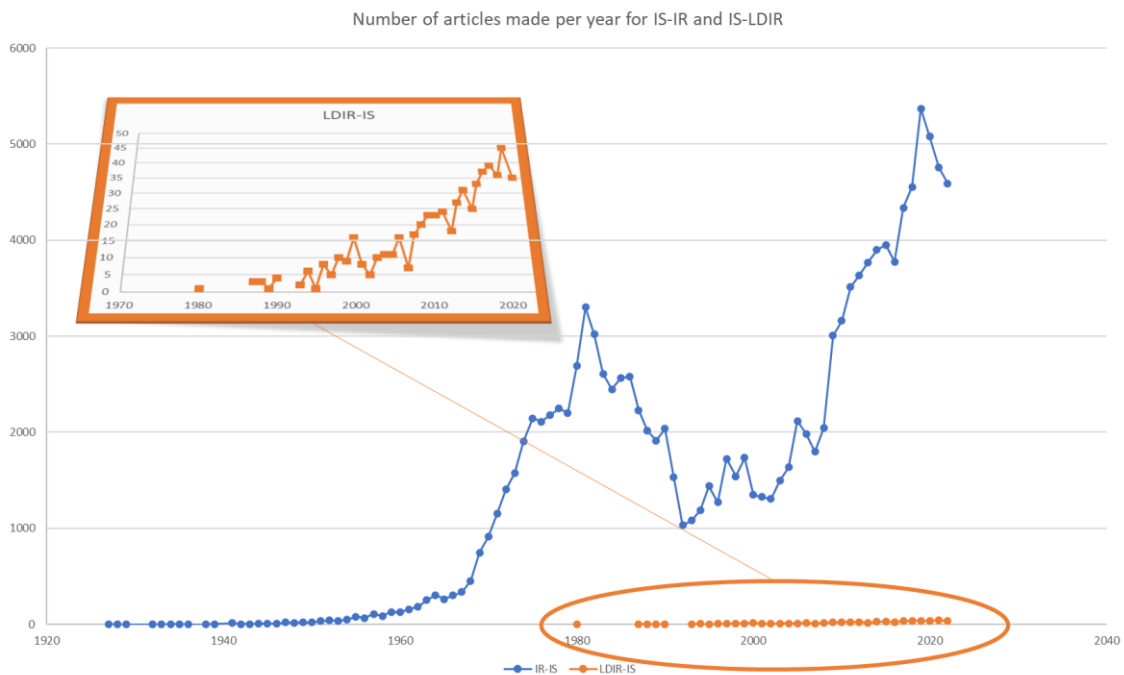


Figure 1 – Comparison of the Number of articles made per year for IS-IR and IS-LDIR, data found on Web of Science™ databases.

There was a first peak of studies on IS-IR around 1981-1982, which also match the time the first articles on IS-LDIR were published, with a second peak in recent days/years.

Out of the 100 articles, a second screen was made. The inclusion criteria were: experimental articles, not reviews; with a major focus on “IS-LDIR” and not deviate too much from such topic; and to have at least one set of results related to a radiation dose ≤ 100 mGy, that is clear and easily distinguishable from results provided by other doses of irradiation. The final selection resulted in 45 out of the 100 articles, with the following reasons for exclusion:

- Lowest dose of radiation used >100 mGy – 34
- Doesn't fit the theme- 10
- Somewhat fits the theme, not completely- 4

- No distinction between LDIR and its effects- 1
- Can't collect data on LDIR effects- 2
- Article not available- 3
- Not an actual article- 1
- For bulleted lists

These results reveal that the definition of LDIR is not clear, with almost 40% of articles not using LDIR doses, according to the current formal definition, despite showing up on our search results.

The Articles: Models, Sources, and Doses of Radiation and Analysis Methods

The articles that were found have models that essentially divide into 4 main groups: 27 articles use murine (Courtade et al. 2001; Lacoste-Collin et al. 2007; Shigematsu et al. 2007; Xie et al. 2007; Bogdandi et al. 2010; Gridley et al. 2010; Howell et al. 2011; Rizvi et al. 2011; Li HH et al. 2015; Song et al. 2015; Buldakov et al. 2016; Candeias et al. 2017; Song et al. 2017; Szatmari et al. 2017; Gao et al. 2018; Nowosielska et al. 2018; Persa et al. 2018; Zhou et al. 2018; Kesaniemi et al. 2019; Liu J et al. 2019; Premkumar et al. 2019; Puukila et al. 2019; Saeed and Abolaban 2020; Saeed et al. 2020; Bahreyni-Toossi et al. 2021; Khan et al. 2021; Rey et al. 2021), 9 articles use humans (Zakeri et al. 2010; Li K et al. 2014; Gyuleva I et al. 2015; Gyuleva IM et al. 2015; Shahid, Chaudhry, et al. 2015; Shahid, Mahmood, et al. 2015; Karimi et al. 2017; Ebrahimiyan et al. 2021; Gyuleva et al. 2021), 6 use human cells (Jahns et al. 2011; El-Saghire et al. 2013; Park et al. 2015; Buldakov et al. 2016; Son et al. 2019; Fang et al. 2022) and the other 5 use murine cells (Joo et al. 2012; Lacoste-Collin et al. 2015; Song et al. 2017; Cho et al. 2019; Deloch et al. 2019). In the first group, majority of studies used C57BL/6 mice (Courtade et al. 2001; Shigematsu et al. 2007; Bogdandi et al.

2010; Gridley et al. 2010; Rizvi et al. 2011; Li HH et al. 2015; Song et al. 2015; Song et al. 2017; Szatmari et al. 2017; Nowosielska et al. 2018; Persa et al. 2018; Premkumar et al. 2019), one of these not using wild-type mice (Rey et al. 2021) and BALB/c mice (Shigematsu et al. 2007; Howell et al. 2011; Nowosielska et al. 2018; Liu J et al. 2019; Premkumar et al. 2019; Bahreyni-Toossi et al. 2021), with the rest of the articles using different murine, like CBA/Ca and ICR mice (Lacoste-Collin et al. 2007; Xie et al. 2007; Howell et al. 2011; Candeias et al. 2017; Gao et al. 2018; Zhou et al. 2018; Kesaniemi et al. 2019; Puukila et al. 2019). In the second group, articles either use workers who work in environments with artificial exposure to IR (Zakeri et al. 2010; Li K et al. 2014; Gyuleva I et al. 2015; Gyuleva IM et al. 2015; Karimi et al. 2017; Ebrahimiyan et al. 2021; Gyuleva et al. 2021) or people who live in areas with naturally high IR levels as subjects (Shahid, Chaudhry, et al. 2015; Shahid, Mahmood, et al. 2015).

More than half of the articles use sources like X-ray (Jahns et al. 2011; El-Saghire et al. 2013; Buldakov et al. 2016; Candeias et al. 2017; Szatmari et al. 2017; Gao et al. 2018; Persa et al. 2018; Zhou et al. 2018; Deloch et al. 2019; Puukila et al. 2019; Son et al. 2019) and γ -ray (Shigematsu et al. 2007; Bogdandi et al. 2010; Rizvi et al. 2011; Joo et al. 2012; Li HH et al. 2015; Park et al. 2015; Song et al. 2015; Song et al. 2017; Cho et al. 2019; Premkumar et al. 2019; Bahreyni-Toossi et al. 2021; Rey et al. 2021; Fang et al. 2022) generators externally, with others being environmental/occupational radiation (Zakeri et al. 2010; Howell et al. 2011; Li K et al. 2014; Gyuleva I et al. 2015; Gyuleva IM et al. 2015; Shahid, Chaudhry, et al. 2015; Shahid, Mahmood, et al. 2015; Karimi et al. 2017; Kesaniemi et al. 2019; Ebrahimiyan et al. 2021; Gyuleva et al. 2021), among others, either externally or internally (Courtade et al. 2001; Lacoste-Collin et al. 2007; Xie et al. 2007; Gridley et al. 2010; Lacoste-

Collin et al. 2015; Nowosielska et al. 2018; Liu J et al. 2019; Saeed and Abolaban 2020; Saeed et al. 2020; Khan et al. 2021).

The doses used ranged from as little as 0.15 μ Gy (Kesaniemi et al. 2019), to the upper limit of 100 mGy (Courtade et al. 2001; Lacoste-Collin et al. 2007; Shigematsu et al. 2007; Bogdandi et al. 2010; Joo et al. 2012; El-Saghire et al. 2013; Li HH et al. 2015; Park et al. 2015; Song et al. 2015; Buldakov et al. 2016; Candeias et al. 2017; Song et al. 2017; Szatmari et al. 2017; Nowosielska et al. 2018; Persa et al. 2018; Deloch et al. 2019; Liu J et al. 2019; Premkumar et al. 2019; Bahreyni-Toossi et al. 2021; Khan et al. 2021; Rey et al. 2021), which is also the most used dose. Out of 94 irradiation instances, we can divide them into 3 groups: 0-10 mGy (35), 11-50 mGy (31), and 51-100 (28). Of all these, 54 of them were acute and 40 were chronic. In terms of biological impact evaluation, 23 articles used flow cytometry, being the most used method. The other most used methods include RT-PCR (18 articles), ELISA (16 articles), and hematologic analysis (11 articles). More information on the results can be found in Table 1.

Result analysis

To assess the results obtained in these studies, all statistically significant changes were compiled, dividing them into four different parameters: cytokines, cell counts (absolute and relative), gene expression/protein production, and other effects (i.e.: cell activity, anti-tumoral activity, ...). These changes were further divided into two groups, increases and decreases. The top five changes of each group (for this matter, the last two groups were joined due to their relatively low statistical sampling), together with all changes that were found at least 5 times, were analyzed and classified accordingly, with the dose of exposure, the model used, time after irradiation, whether the irradiation was acute or chronic, and other relevant data.

RESULTS

In this section, all data mentioned will be summarized in Tables 1, 2, and 3. Also, all data found that is and isn't mentioned and all information related to the articles can be found in Table 4.

CYTOKINES

Table 1 summarizes the results for cytokines. IFN-gamma was the most increased cytokine, in 25 different instances, the second increased cytokines had only 9. While 16 of these instances happened after acute irradiation, the other 11 occurred after chronic irradiation, with two of them preceding HDIR. These increases were found 1 day after irradiation at the earliest, and 35 days after, at the latest, spanning doses from 1 to 100 mGy. It was also the fifth most decreased cytokine, with 4 out of 5 of the results happening after acute irradiation. These changes appear to have happened much earlier though, between 4 hours and 1 day after irradiation. These changes were found in 13 out of 16 articles that studied this parameter.

The most decreased cytokine was IL-4 in 14 different instances. The majority of these occurred after acute irradiation, only one of them preceding HDIR, and only 4 instances happening after chronic irradiation. These decreases have mainly happened earlier, between 4 hours after and 7 days after irradiation. 5 out of 14 happened after a dose of lower than 50 mGy, with the rest of them happening between 50 and 100 mGy. It's also the joint sixth biggest increase, with 4 of them resulting after acute radiation, with one of them preceding HDIR. These changes happened between 1 and 7 days. These significant changes were found in 8 out of 10 articles.

GM-CSF was the second biggest increase with 9, 6 of them being a result of acute radiation. Most data were obtained after a dose of 50 mGy, with the results occurring early, between 4 hours and 3 days after irradiation. All 3 articles studying this cytokine showed significant changes.

IL-10, IL-2, and IL-5 were joint third for most increased cytokine, with 8 instances. While IL-2 and IL-5 both only have 2 results from chronic irradiation, IL-10 has most of them, with 5. IL-2 and IL-5 changes occur around the same timeline, with IL-2 between 1 and 2 days and IL-5 between 4 hours to 3 days. IL-10 is also different in this regard, with data being shown between 1 to 7 days. IL-10 is also the third most decreased cytokines, with 7 instances, in this case only 1 of these happens due to chronic irradiation and happened either 2 or 7 days after irradiation. IL-10 was found to change significantly in 9 of 13 articles, with IL-2 and IL-5 in 7 out of 10 and 3 out of 4, respectively.

IL-6 and IL-12 join IL-4 with 7 instances of increasing, with 2 and 3 out of 7 being from chronic radiation, respectively. The data spread related to dosage is very similar, although, in IL-12, there are two results related to a dose of 1 mGy, the rest of the data fits somewhat between three doses, 10, 50, and 100 mGy. While IL-6 showed changes in 6 articles out of 7, IL-12 showed in only 4 out of 6.

TNF- α is the second biggest decrease, with 10 instances, 6 out of these happening due to chronic irradiation. These changes were found very early, with most of them being found 5 hours after irradiation. The doses go from <1 mGy to 100 mGy. It is also the ninth biggest increase, with only two of them being a result of chronic irradiation. These increases have about the same dose range (10-75 mGy) and the same timeframe (4 hours to 2 days after). Despite these results, TNF- α has the lowest

result-to-research ratio, with only 6 out of 13 articles studying these changes finding statistically significant differences.

TGF-beta is the last cytokine to comply with our selection, with six instances of decreases, making it the fourth biggest, all of them being the result of acute irradiation, with one of them preceding HDIR irradiation. Results show that the changes happened between 1 and 3 days, with doses between 1 and 100 mGy. TGF-beta was found to change significantly in 5 out of 7 articles that studied this parameter.

Table 1- Number of instances of change in cytokines

Cytokines	Increased			Decreased		
	acute irradiation	chronic irradiation	Total	acute irradiation	chronic irradiation	Total
IFN-gamma	16	10	26	4	1	5
GM-CSF	6	3	9	0	0	0
IL-10	3	5	8	6	1	7
IL-2	6	2	8	0	0	0
IL-5	6	2	8	0	0	0
IL-6	5	2	7	0	0	0
IL-12	4	3	7	0	0	0
IL-4	3	4	7	10	4	14
TNF-alpha	2	4	6	4	6	10
TGF-beta	0	0	0	6	0	6

CELLS

Lymphocytes T CD8+ (in percentage) had the most instances of change, with 18 being decreases, making them the cells with the most decreases of cells, and 4 increases, making it the joint fourth most increases of cells. The decreases were split, with chronic irradiation being responsible for 8 instances, and acute irradiation for 10 instances. The doses were spread between 1 and 100 mGy, with results between 1 day and 32 days after irradiation. The increases only had 1 instance of chronic irradiation and had results for doses 1, 10, and 100. These results happened much earlier though, between 1 and 2

days. Out of 12 articles, 8 of them showed significant differences.

Dendritic cells were second for most decreases (in percentage) of cells, with 10 instances, only 3 of them being a result of chronic irradiation. These changes happen between 1 and 7 days after irradiation, with doses ranging from 1 to 100 mGy. These significant changes were found in all 3 articles analyzing them.

NK cells showed the most instances of increase (in percentage), with 8, with 3 of them due to acute radiation, two of them preceding HDIR. These changes have been shown in two very different timeframes, 2 of them happened 4 days after irradiation, and the other happened much later, between 3.5 to 8 months. The doses also divide results into two groups, 6 of them result from a dose of 10 mGy, the other 2 from 100 mGy. Out of 7 articles, 4 showed statistically significant changes.

Lymphocytes follow in second with 5 instances of increasing changes (in absolute measures), with 3 of them being due to chronic irradiation, and one of the others preceding HDIR. These changes happened either 24h or 7 days after irradiation, with doses either <2 mGy or 100 mGy. They're also the fourth in decreases, with 6. All the results are due to acute radiation, followed by HDIR, and half of those are decreases when compared to LDIR by itself. These changes happened at 4 and 21 days after irradiation. Out of 7 articles measuring these, 4 showed statistically significant changes.

Splenocytes (in percentage) are third in decreases, with seven instances, all of them due to acute LDIR. This effect was found earlier, from 1 to 7 days after irradiation, with doses like 10, 50, and 100 mGy. Although 3 out of 3 articles that studied this parameter showed changes, only 1 showed these negative effects.

In third place for increases, we found monocytes/macrophages (in percentage), with 5 instances. All of them happened due to acute LDIR, and 3 of those were

followed by HDIR. Results happened either between 4 or 21 days after irradiation, due to 10 or 100 mGy. 3 out of 3 articles showed statistically significant changes.

Lymphocytes T CD4+ (in percentages) were fifth in increases and joint fourth in decreases, with 4 and 6 instances, respectively. In both cases, only one instance resulted due to chronic LDIR, with doses between 1 and 100 mGy. They differ in timing, with the increases happening earlier, 1 or 2 days after irradiation, and with the increases happening later, in 3 to 7 days. These results have the worst research-to-result ratio, with only 4 out of 12 showing significant changes.

Lastly, lymphocytes B (in percentage) were also joined fourth in decreases, with six instances, all of them happening due to acute LDIR, two of them followed by HDIR. These results had two very different time points, with 4 of them happening between 3, 4, or 7 days after irradiation, and the other 2 happening 6 months after. Doses were either 10 or 100 mGy. Out of 5 studies, 3 of them found differences with statistical significance.

Table 2- Number of instances of change in cells

Cells	Increased			Decreased		
	acute irradiation	chronic irradiation	Total	acute irradiation	chronic irradiation	Total
NK cells (%)	3	5	8	0	0	0
T CD8 ⁺ cells (%)	2	2	4	10	8	18
Lymphocytes (%)	2	3	5	6	0	6
Mono/Macrophages (%)	5	0	5	0	0	0
T CD4 ⁺ cells (%)	3	1	4	5	1	6
Dendritic cells (%)	0	0	0	7	3	10
Splenocytes (%)	0	0	0	7	0	7
B cells (%)	0	0	0	4	2	6

OTHER EFFECTS

RNS production is the first in increases, with 12 instances, all of them acute, 2 of them following 2 Gy. These results happened in different timeframes, between 24-48 hours,

and 8 to 12 days. They can also be divided into two groups of doses, with 5 being <20 mGy, and the other 7 being due to 100 mGy. All 4 articles showed significant statistical deviations.

Joint first with RNS production, MAPK phosphorylation had 12 instances of increase, all of them acute, and all of them due to a dose of 100 mGy, with only one of them happening with further irradiation with LDIR. They all happened very early, between 1h and 72h after irradiation. Out of 3 articles, 2 of them showed significant differences.

Primary tumor growth was the most decreased parameter, with 8 instances, all of them due to acute radiation, and only two of them not being by followed HDIR radiation. These results happened between 2 and 5 days, with the only doses being 75 and 100 mGy. Out of 4 articles, 3 of them showed significant differences.

Third in increases, NF- κ B expression showed 6 instances, with half being with chronic irradiation. With chronic irradiation, these changes happened 2 days after, and with acute irradiation, they happened 7 days after. These instances were divided into three different doses, 1, 10, and 100 mGy. We found only one article studying this parameter.

Nrf2 expression and NK cell cytotoxicity were joined fourth in increases with five instances. Only one instance of Nrf2 was due to chronic LDIR, with 9 being due to acute LDIR. While both have instances happening due to doses of 10 and 100 mGy, Nrf2 expression and NK cell cytotoxicity had instances due to 1 and 50 mGy, respectively. Their timeframe was vastly different, with Nrf2 expression happening earlier, between 1 and 7 days after LDIR, and the other happened much later, between 9 and 35 days after. They had the same research-to-result ratio, having 2 out of 2 articles with significant statistical deviations.

Also with 5 instances, Splenocyte apoptosis was second in decreases, with all of them happening due to acute LDIR. All instances happened very early, between 30 min to 24 hours after irradiation, with doses between 2 and 20 mGy. 2 out of 3 articles showed significant statistical changes.

Third in decreases, joint with 2 other parameters, secondary tumor growth had 4 instances, all of them due to acute LDIR that was followed by HDIR. These results happened between 2 to 4 days, all of them due to a dose of 100 mGy. Only one article studied this parameter, and it also showed significant differences.

The other two parameters that were joined third were Gpx-1 and Sod2 expression. These changes happened in the same study, with chronic doses between 0,876 and 1,403 mGy per year.

Table 3- Number of instances of changes in other parameters

Others	Increased			Decreased		
	acute irradiation	chronic irradiation	Total	acute irradiation	chronic irradiation	Total
MAPK phosphorylation	12	0	12	0	0	0
NO production	12	0	12	0	0	0
NF-kB expression	3	3	6	0	0	0
Nrf2 expression	4	1	5	0	0	0
NK cytotoxicity	5	0	5	0	0	0
Primary tumor growth	0	0	0	8	0	8
Splenocyte apoptosis	0	0	0	5	0	5
Secondary tumor growth	0	0	0	4	0	4
Gpx-1 expression	0	0	0	0	4	4
Sod2 expression	0	0	0	0	4	4

Discussion

LDIR was shown to induce/increase the activation of the Mitogen-activated protein kinases, also known as MAPKs (Joo et al. 2012; Premkumar et al. 2019), which are kinases that convert extracellular stimuli into various cellular responses, regulating gene expression, mitosis, metabolism, motility, survival, apoptosis, and differentiation. They

are divided into 2 groups, conventional MAPKs, and unconventional MAPKs, which also divide into subgroups, 4 (ERK1/2, p38 MAPK, JNK, and ERK5 modules) and 3 (ERK3/4, ERK7, and NLK), respectively (Cargnello and Roux 2011). This effect happens very early, between 1 and 72h after LDIR, with or without the activation preceding irradiation, and the activation of modules like p38 MAPK, which plays a central role in normal immune and inflammatory responses (Cuadrado and Nebreda 2010), or ERK1/2, which is responsible for cell proliferation (Meloche and Pouyssegur 2007), might be responsible for increases in proliferation and activation of immune cells.

Another notable effect was the increase in Nuclear factor- κ B activation, or NF- κ B (Song et al. 2015), which represents a large family of transcription factors that regulate a wide range of genes involved in various processes of immune and inflammatory responses (Liu T et al. 2017). This increase happened due to chronic and acute LDIR, in a variety of doses, in a relatively early period after irradiation, and, in junction with MAPKs, it might also help to explain the augmentation of the immune activity shown, as well as the anti-tumor effect shown, as NF- κ B was shown to play a tumor-suppressive role in certain cancers (Li K et al. 2014).

Acute irradiation and chronic irradiation seem to elicit inverse effects, especially in cytokines, which have shown different tendencies depending on how LDIR was administered.

Acute LDIR shows to increase interferon-gamma, or IFN- γ , in various doses, as early as 1 day after irradiation (Xie et al. 2007; Song et al. 2015; Karimi et al. 2017; Gao et al. 2018; Nowosielska et al. 2018; Zhou et al. 2018; Cho et al. 2019), although in one of the studies, it seems that in an earlier timeframe, with decreases happening 4h to 1 day after irradiation (Bogdandi et al. 2010). IFN- γ is a cytokine primarily secreted by

activated T cells and NK cells, which promotes macrophage activation, mediates antiviral and antibacterial immunity, antigen presentation, activation of IIS, induces Th1 polarization, and controls cell proliferation and apoptosis (Tau and Rothman 1999; Ivashkiv 2018). This might result not only in a shift to Th1 and Th17, but also the stimulation of RNS production, as seen in some articles after acute LDIR irradiation (Lacoste-Collin et al. 2015; Song et al. 2017; Nowosielska et al. 2018; Premkumar et al. 2019), which are involved in pathogenesis, control of infectious diseases, tumors, and other diseases (Bogdan 2001).

IL-6 was also increased around 4 hours to 3 days after acute irradiation (Bogdandi et al. 2010; Buldakov et al. 2016). IL-6 is synthesized in a local lesion in the initial stage of inflammation, which acts on multiple cells and has an important role in acquired immune response, stimulating Th17 and T cell differentiation, inhibiting Treg differentiation, enhancing antibody production, and others (Tanaka et al. 2014).

IL-12 was increased by both acute (Shigematsu et al. 2007; Song et al. 2015) and chronic LDIR (Song et al. 2015), 7 and 2 days respectively. This cytokine is produced by B lymphocytes, macrophages, and dendritic cells after activation, and acts in various cells, like CD8⁺ T cells, inducing differentiation into cytotoxic T lymphocytes, and NK cells, leading them to proliferate and increase cytotoxicity, CD4⁺ T cells, inducing Th1 polarization and inhibiting Th2 polarization, and plasma cells, inducing the production of IgG and inhibiting production of others (Liu J et al. 2005). This increase might lead to not only Th1 proliferation but also might be responsible for the increases seen in NK cells (Gridley et al. 2010; Song et al. 2017; Khan et al. 2021) and their cytotoxicity (Xie et al. 2007; Nowosielska et al. 2018) in some of the analyzed articles.

Another cytokine increased by acute LDIR (Bogdandi et al. 2010; Zhou et al. 2018), and decreased by chronic LDIR (Howell et al. 2011; Rizvi et al. 2011; Joo et al. 2012) was TNF-alpha. This pro-inflammatory cytokine is produced by Th1 cells and macrophages (Jang et al. 2021) and plays important roles in processes such as immunomodulation, fever, inhibition of tumor formation, and viral replication. It also activates signaling pathways like NF- κ B or MAPK (You et al. 2021). TNF-alpha increase might be responsible for the activation of NF- κ B and/or MAPK seen in other articles, and might be a signal of Th1 polarization, and seems to be followed by the increase of monocytes/macrophages noted in some articles (Gridley et al. 2010; Song et al. 2017). Despite this, the data gathered showed that most articles did not find differences in TNF-alfa expression, so this effect might not be real, despite making sense overall.

IL-2 was also increased around 1 to 2 days after acute irradiation (Shigematsu et al. 2007; Bogdandi et al. 2010; Gao et al. 2018; Zhou et al. 2018). IL-2 is a cytokine produced mainly by Th cells and by T, NK, and NKT cells to a lesser extent. Its production is usually induced strongly by antigen activation. It's crucial for the maintenance of Treg cells and the differentiation of CD4+ T cells, leading to the polarization of Th cells into Th1, Th2, and Th17 (Boyman and Sprent 2012). This increase, coupled with the increases of IFN- γ , IL-6, IL-12, and TNF-alfa, might lead to Th1 and Th17 polarization and pro-inflammatory reactions.

IL-4 was one of the cytokines that showed a radical difference between acute LDIR (Bogdandi et al. 2010; Joo et al. 2012; Song et al. 2015; Gao et al. 2018; Bahreyni-Toossi et al. 2021), with decreases, and chronic LDIR (Song et al. 2015; Fang et al. 2022), with increases. IL-4 is an anti-inflammatory cytokine known for type 2 immune responses, inducing Th2 polarization, B cell antibody production and isotype

switch to IgE, expansion of basophils and eosinophils, and others (Heeb et al. 2020).

Despite some contradicting results, most data seem to support that chronic LDIR induces an anti-inflammatory response in the immune system.

IL-10 seemed to follow the same trend as IL-4, with acute (Song et al. 2015; Song et al. 2017; Zhou et al. 2018), and chronic irradiation (Li K et al. 2014; Song et al. 2015) eliciting decreases and increases respectively. IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine that plays an essential role in preventing pathologies related to inflammation or autoimmunity, limiting host immune responses to pathogens, resulting in damage prevention to the host, and maintaining homeostasis of the tissue (Iyer and Cheng 2012). This result seems to be consistent with the radiation application, despite the existence of contradicting data (Bogdandi et al. 2010; Zakeri et al. 2010; Persa et al. 2018; Cho et al. 2019).

TGF-beta is the other cytokine that seems to be decreased by acute LDIR (Bogdandi et al. 2010; Gao et al. 2018; Bahreyni-Toossi et al. 2021; Fang et al. 2022), as all data point towards it. This powerful anti-inflammatory cytokine has a crucial role in wound healing, immunoregulation, angiogenesis, and cancer. TGF-beta can also contribute to the differentiation of inflammatory Th17 cells when joined with IL-6. In an early stage of cancer, TGF-beta inhibits the proliferation and growth of cancer cells, but in a later stage, cancer cells use TGF-beta to help with invasion and metastasis (Prud'homme 2007). With IL-4 and IL-10, it seems that chronic LDIR has a positive effect on the expression of these cytokines, inducing an anti-inflammatory response, and possibly leading to Th2 polarization.

Another cytokine that was increased by acute (Bogdandi et al. 2010) but also chronic LDIR (Rizvi et al. 2011; Li K et al. 2014) was the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, or GM-CSF, which is a hematopoietic growth factor and

immune modulator, important for the activity of circulating leukocytes. Produced by a variety of cells like T cells, macrophages, endothelial cells, and fibroblasts upon receiving immune stimuli, recruiting immune cells like neutrophils, monocytes, and lymphocytes, to enhance host defense (Shi et al. 2006). These increases happen 4h to 3 days after irradiation and could increase immunity while increasing the number of mono/macrophages, which was seen after acute LDIR(Gridley et al. 2010; Song et al. 2017) around the same timeline.

IL-5 showed increases around 4 hours to 3 days after acute irradiation (Bogdandi et al. 2010; Song et al. 2015). IL-5 is a cytokine that activates B cells and eosinophils, inducing their proliferation, survival, and differentiation (Takatsu et al. 2005). This increase, coupled together with GM-CSF, might result in the proliferation, differentiation, and activation of eosinophils and B cells.

Cells that seem most negatively affected by LDIR are CD8+ T cells with acute (Bogdandi et al. 2010; Gridley et al. 2010; Song et al. 2015) at early stages and chronic irradiation at later stages (Lacoste-Collin et al. 2007; Song et al. 2015), with only a few articles showing increases, DCs, also with acute (Bogdandi et al. 2010; Song et al. 2015) and chronic effects (Song et al. 2015), both with early effects and all splenocytes, with acute LDIR (Bogdandi et al. 2010) also in an earlier timeline, indicating that these cells might be more radiosensitive. The most positively affected were NK and mono/macrophages, as mentioned above.

LDIR contributed to the decrease of primary and secondary tumor growth, most times when combined with HDIR, which might indicate that, not only does LDIR increase anti-tumor capacity, but also induces an adaptative response, increasing the organism's capacity to react to HDIR.

Chronic LDIR seems to affect decrease Sod2 and Gpx-1 expression (Howell et al. 2011), which are two enzymes responsible for protection against ROS, leaving the organism more susceptible to oxidative stress.

A somewhat controversial result is the expression of the Nuclear factor erythroid 2-related factor gene, or Nrf2, which was found to be increased by acute LDIR (Song et al. 2015; Song et al. 2017). NFR2 is a transcription factor that regulates cellular defense against toxic and oxidative results, turning cells resistant to chemical carcinogens and inflammatory challenges, by inducing anti-inflammatory responses. In such a context, although acute LDIR seems to induce pro-inflammatory responses, it could also include this increase in very specific anti-inflammatory responses, reflecting the production of ROS.

Conclusion

Irradiation with LDIR will activate both MAPK and NF- κ B pathways, which will induce immune cell proliferation, activation (which induces production of IL-2), polarization, and cytokine production, depending on if LDIR is irradiated acutely or chronically.

Acute LDIR seems to induce the production of pro-inflammatory cytokines. A shift towards Th1 and Th17 lymphocytes and an increase in NK cells and macrophage proliferation and cytotoxic activity also seem to occur, the latter being confirmed by an increase in RNS production. Despite this, acute LDIR also showed a negative effect in cell counts, with splenocytes, CD8+ T cells, and DCs being the main targets, being more radiosensitive. Nrf2 upregulation, although contradicting, might happen due to ROS production, (the most common effect of irradiation), to mitigate its effects.

Acute LDIR seems to also induce an adaptative reaction to further irradiation and, when combined with radiotherapy, seems to have anti-tumoral activity.

Chronic LDIR appears to do the opposite, leading to an anti-inflammatory response, with decreases in TNF- α and increases in IL-10 and Il-4. Th2 polarization, B cell activation, and isotype switch to IgE and basophile and eosinophile proliferation/activation were also found. It might also lead to ROS vulnerability, as there was a reduction in Sod2 and Gpx-1 expression. Everything was summarized and can be seen in Figure 2.

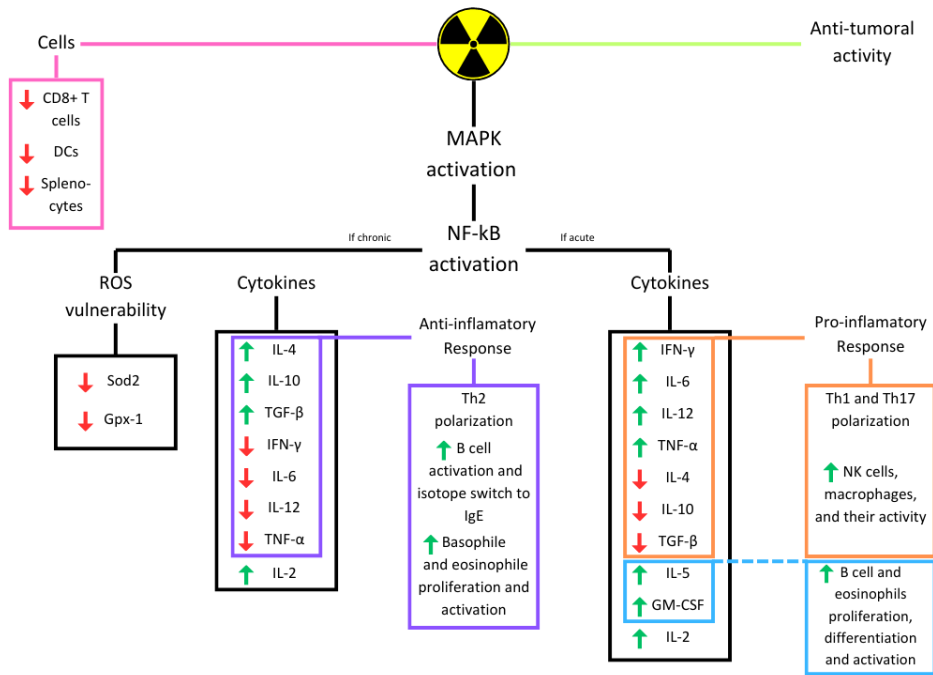


Figure 2- Summary of key findings from this review

Disclosure statement

The authors report no conflict of interest.

Table 4- All relevant data collected from the analyzed articles: ↓- significantly reduced; ↘- reduced, but not significantly; ↔- didn't change;

↗- increased, not significantly; ↑- significantly increased.

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
Effects of Low-Dose Radiation on the Immune System of Mice after Total-Body Irradiation Bogdandi et al. (2010)	Female C57BL/6 mice	10, 50, and 100 mGy	External Gamma rays	Flow cytometry, TUNEL assay, RT-PCR	<p>↓ Apoptosis of total splenocytes (10 mGy), CD4+ T cells (10 and 50 mGy), NK cells (50 mGy), and DCs (50 mGy)</p> <p>↑ % CD4+, CD8+ T cells, and Tregs (10 mGy, day 1)</p> <p>↓ % CD8+ T cells and DCs (50 mGy, day 1)</p> <p>↓ % total splenocytes, Tregs, and DCs (100 mGy, day 1)</p> <p>↓ % total splenocytes and CD8+ T cells (all doses, day 3)</p> <p>↓ % CD4+ T cells (10 and 100 mGy, day 3)</p> <p>↓ % DCs (50 mGy, day 3)</p> <p>↑ % memory CD8+ T cells (50 and 100 mGy, day 3)</p> <p>↓ % total splenocytes, CD4+ T cells, and CD8+ T cells (all doses, day 7)</p> <p>↓ % Tregs (50 and 100 mGy, day 7)</p> <p>↓ % B cells (10 and 100 mGy, day 7)</p> <p>↓ % NK cells (50 and 100 mGy, days 3 and 7)</p> <p>↑ IL-6, TNF-alpha, TGF-beta (10 mGy, 4 hours)</p> <p>↓ IFN-gamma, IL-4, IL-12 (10 mGy, 4 hours)</p> <p>↑ GM-CSF, IL-6, LT-beta (50 mGy, 4 hours)</p> <p>↓ IFN-gamma, IL-12 (50 mGy, 4 hours)</p> <p>↑ IL-5, IL-6 (100 mGy, 4 hours)</p> <p>↑ GM-CSF (10 mGy, day 1)</p> <p>↓ IFN-gamma, IL-2, TGF-beta, GDF15 (10 mGy, day 1)</p> <p>↑ IL-2 (50 mGy, day 1)</p> <p>↓ IFN-gamma, IL-4, GDF15 (50 mGy, day 1)</p> <p>↓ IL-4, TGF-beta (100 mGy, day 1)</p> <p>↓ IL-4, LT-beta (10 mGy, day 3)</p> <p>↓ IL-2, IL-6, TNF-alpha (50 mGy, day 3)</p> <p>↑ IL-10 (100 mGy, day 3)</p> <p>↓ IL-2, IL-4, LT-beta, TGF-beta (100 mGy, day 3)</p> <p>↑ GM-CSF, IL-5 (50 and 100 mGy, days 1 and 3)</p>
Extracellular Vesicles Mediate Radiation-	Male C57BL/6 mice	100 mGy	External X-rays	Flow cytometry, TUNEL assay, RT-PCR,	<p>↑ Mean number of aberrations per cell (irradiated dose)</p> <p>↑ % cells with cellular aberrations (bystander effect)</p> <p>↓ Hematopoietic cells (BM, irradiated)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Induced Systemic Bystander Signals in the Bone Marrow and Spleen</p> <p>Szatmari et al. (2017)</p>				KEGG and GO analysis	<p>↗ Lymphocytes (BM, bystander)</p> <p>↗ T CD4, CD8, B, and NK cells (spleen, irradiated)</p> <p>↓ T CD4 and CD8 cells (spleen, bystander effect)</p> <p>↓ T CD4 in proliferation (spleen, bystander effect)</p> <p>↑ Proliferating NK cells (spleen, bystander)</p>
<p>Exposure to environmental radionuclides is associated with altered metabolic and immunity pathways in a wild rodent</p> <p>Kesaniemi et al. (2019)</p>	Bank vole	18.03, 14.74, 0.15 and 0.30 μGy/h	Natural radiation	Sequencing, de novo transcriptome assembly, gene co-expression networks, stable isotope analysis	<p>↑ Genes involved in the innate immune response</p> <p>↓ Genes associated with protein ubiquitination in the spleen and with heavy and light chains of Igs.</p> <p>↓ Key genes of AIS.</p>
<p>Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells</p> <p>Park et al. (2015)</p>	Human B lymphoblast cell lines IM-9, C1R-sB7, Jurkat leukemia lines, and JM1 lymphoma line	10 (chronic), 50 (chronic and acute), and 100 (acute) mGy	External Gamma rays	XTT assay and western blot	<p>↑ IM-9 cell survival (50 and 100 mGy)</p> <p>↔ Cell survival (other cell lines)</p> <p>↓ Apoptosis (LDIR + HDIR 10 and 50 mGy, compared to HDIR irradiation)</p> <p>↑ ERK phosphorylation (after LDIR irradiation and LDIR + HDIR compared to HDIR)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Effects of low-dose irradiation on mice with Escherichia coli-induced sepsis</p> <p>Song et al. (2017)</p>	<p>Female 6-week-old C57BL/6 mice and RAW264.7 macrophages</p>	100 mGy	External gamma rays	Quantification of CFUs, ELISA, flow cytometry, MTT assay, and RT-PCR	<p>↑ Survival of infected mice</p> <p>↓ Expression of IL-6, IL-1beta, and IL-10 (compared to untreated infection)</p> <p>↑ % Peritoneal macrophages</p> <p>↑ Production of NO</p> <p>↑ % Total T cells, CD8+, DCs, macrophages, and NK cells, and markers CD25, CD69, CD80, and CD86 (compared to control)</p> <p>↗ % Total T cells, CD8+, DCs, and NK cells (compared to untreated infection)</p> <p>↑ % Macrophages (compared to untreated infection)</p> <p>↑ iNOS, Nrf2, and HO-1 (compared to control)</p> <p>↓ iNOS (compared to untreated infection)</p> <p>↑ Nrf2 and HO-1 (compared to untreated infection)</p>
<p>Low-dose radiation accelerates the aging of the T-cell receptor repertoire in CBA/Ca mice</p> <p>Candeias et al. (2017)</p>	CBA/Ca mice	10 and 100 mGy	External X-rays	Sequencing and DNA identification	<p>↓ VDJ sequence diversity (100 mGy, productive and non-productive, 1st and 6th month)</p> <p>↑ VDJ sequence diversity (100 mGy, productive and non-productive, 3rd month)</p> <p>↓ V gene diversity (100 mGy, productive, all months)</p> <p>↑ Productive/non-productive ratio (100 mGy, all months)</p>
<p>Low doses of ionizing radiation induce immune-stimulatory responses in isolated human primary monocytes</p> <p>El-Saghire et al. (2013)</p>	Human blood monocytes	50 and 100 mGy	External X-rays	qRT-PCR and ELISA	<p>↑ Expression of TLR4, MyD88, p38, ERK, JNK, and PF4 (50 mGy)</p> <p>↑ Expression of TLR9 (100 mGy)</p> <p>↑ Expression of HMGB1, IRAK1, and pIκBa (50 and 100 mGy)</p> <p>↘ Expression of p38, ERK, JNK, and PF4 (100 mGy)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
Validating the pivotal role of the immune system in low-dose radiation-induced tumor inhibition in Lewis lung cancer-bearing mice Zhou et al. (2018)	Lewis lung cancer-bearing mice	75 mGy	External X-rays	WST-1 assay, flow cytometry, spectrophotometry, histopathology, and immunohistochemistry	<p>↓ Tumor growth (LDR and LDR-HDR)</p> <p>↑ Survival of mice (LDR and LDR-HDR)</p> <p>↑ % activated NK and CD8+ T cells (LDR and LDR-HDR)</p> <p>↑ Splenocyte cytotoxicity (after 1 and 2 LDR treatments and after 1 LDR-HDR)</p> <p>↑ Tumor cell death (LDR and LDR-HDR)</p> <p>↓ Splenocyte proliferation (HDR-LDR)</p> <p>Cytokines</p> <p>↑ IL-1beta, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha (after 1, 2, and 3 LDR treatments)</p> <p>↓ IL-10 (after 1, 2, and 3 LDR treatments)</p> <p>↓ Cytokine production (HDR-LDR)</p> <p>↔ Cytokine production (LDR-HDR)</p>
Mutations of the human interferon alpha-2b (hIFNa-2b) gene in low-dose natural terrestrial ionizing radiation-exposed dwellers Shahid, Mahmood, et al. (2015)	People living in areas with high natural radiation levels	0.4383-4.55832 mSv per year	Natural radiation	Hematological analysis, PCR, and electrophoresis	<p>↓ Mean cell hemoglobin (52% of people) and mean cell hemoglobin concentration (44% of people)</p> <p>↓ Platelets and % lymphocytes (28% of people)</p> <p>24% with a mutation in the hIFNalpha-2b gene</p> <p>↳ 24% with structural alterations in the protein</p>
Ionizing Radiation Impairs T Cell Activation by Affecting Metabolic Reprogramming	Male wild-type C57BL/6 mice	100 mGy	External gamma rays	Flow cytometry, proliferation assays, ELISA, qRT-PCR, glucose uptake and consumption assays, and ATP	<p>↔ Total T cells and subpopulations</p> <p>↔ Proliferation and activation</p> <p>↘ Cell viability</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
Li HH et al. (2015)				and UPLC levels	
The Effects Of Environmental Low-Dose Irradiation On Tolerance To Chemotherapeutic Agents Howell et al. (2011)	Wild rats (BALB/c mice as positive control)	93 mGy/year (irradiated wild rats), 0.876 and 1.403 mGy/year (control wild rats)	Natural radiation	Genotoxicity tests, microscopy, weighing, and RT-PCR	<p>Genotoxic effects:</p> <ul style="list-style-type: none"> ↓ Micronucleus frequency (VBL, 24h after injection) ↓ Micronucleus frequency (BLM, 48h after injection) ↘ Micronucleus frequency (VBL, 48h and 72h after injection) ↘ Micronucleus frequency (BLM, 72h after injection) <p>↔ Body weight (in all irradiated groups)</p> <ul style="list-style-type: none"> ↑ Leukocytes (BLM and VBL, 48h and 72h) ↑ % Lymphocytes in all groups (BLM, 24h) ↓ % Neutrophils (BLM, 24h) ↗ % Lymphocytes in all groups (LPS, 24h) ↘ % Neutrophils (LPS, 24h) ↑ Frequency of PCEs in irradiated rats (BLM, 24h) <p>Genes</p> <ul style="list-style-type: none"> ↓ Aco1, Cat, Gpx-1, Gstp1, Sod1, Sod2, TNF-alpha, Trp53 (BLM) ↓ Gpx-1, Sod1, Sod2, TNF-alpha, Trp53 (VBL) ↑ GSTP1 (VBL) ↓ Gpx-1, IRF-1, Sod2, TNF-alpha (LPS) ↑ Cat and Trp53 (LPS) ↓ Gpx-1 and Sod2 (SAL) ↑ Sod1 (SAL)
Biological effects of low dose ionizing radiation exposure on interventional cardiologists	Clinicians and interventional cardiologists	8.14 and 30 mSv/year respectively;	Occupational radiation exposure	Hematological autoanalyzer, cytogenetic analysis, radial single immunodiffusion of Mansoni,	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Frequency of aberrant cells and chromosomes; ↑ CD69 expression in CD4+ T cells. <p>Cytokines, Igs, and components of the complement system:</p> <ul style="list-style-type: none"> ↑ IgGs and IL-2 ↓ IL-10 ↗ IFN-gamma, IL-6, and IL-8 ↘ IL-4

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
Zakeri et al. (2010)				ELISA, and flow cytometry	
Effect of internal contamination with tritiated water on the neoplastic colonies in the lungs, innate anti-tumor reactions, cytokine profile, and hematopoietic system in radioresistant and radiosensitive mice	BALB/C (radiosensitive) and C57BL/6 (radioresistant) mice	10 and 100 mGy	Water with tritium (intraperitoneal injection)	51Cr-release assay, hematological analyzer, flow cytometry, spectrophotometry, and cell counter	<ul style="list-style-type: none"> ↑ NK cytotoxic function (BALB/c, 100 mGy, days 9 and 12) ↑ NK cytotoxic function (C57BL/6, 10 mGy, days 14 and 16) ↑ NO production (BALB/c, 100 mGy, days 8 and 9) ↑ NO production (C57BL/6, 10 mGy, days 8, 12, and 16) ↑ IFN-gamma (BALB/c, 100 mGy, days 9 and 12) ↑ IFN-gamma (C57BL/6, 10 mGy, days 14 and 16) ↗ IFN-gamma (C57BL/6, 10 mGy, days 8 and 10) ↗ IL-1Beta (BALB/c, 100 mGy, days 8, 9 and 10) ↗ IL-1Beta (C57BL/6, 10 mGy days 8, 9 and 10)
Nowosielska et al. (2018)					
Effects of various radiation doses on induced T-helper cell differentiation and related cytokine secretion	ICR mice	75 mGy	External X-ray	Microarray and ELISA	<ul style="list-style-type: none"> ↑ 8 genes (LDIR, TH1 related, and TH1 immune response) ↓ 5 genes (LDIR, related to Th1, Th2, and Th3) ↑ 54 genes (HDIR, related to Th1, Th2, Th3 and Th2 immune response) ↓ 5 genes (HDIR, related to Th2) ↑ Stat4 Expression (LDIR) ↓ Expression of Cebpb and Gata3 (LDIR) ↑ Expression of Tbx21, Stat1, Stat4, Irf1, Nfkb1 and Cebpb (HDIR) ↑ IFN-gamma and IL-2 (LDIR)
Gao et al. (2018)					

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
					<p>↓ IL-1beta, IL-4, IL-21 and TGF-beta (LDIR)</p> <p>↑ IL-1beta and TGF-beta (HDIR)</p> <p>↗ IL-4 and IL-21 (HDIR)</p> <p>↓ IFN-gamma (HDIR)</p> <p>↘ IL-2 (HDIR)</p>
<p>Influence Of A Continuous Very Low Dose Of Gamma-Rays On Cell Proliferation, Apoptosis And Oxidative Stress</p> <p>Lacoste-Collin et al. (2015)</p>	<p>Raw 264.7, YAC-1 cell lines and lymphoma cells from female SJL/J mice with lymphoma</p>	<p>9, 18, 27, 36, 45, 54, 63, and 72 mGy (9 mGy increase per week)</p>	<p>External Thorium Nitrate</p>	<p>Chemiluminescence, spectrophotometry, MTT test, Coulter counter, immunohistochemistry</p>	<p>↑ Free radical production (27 and 36 mGy)</p> <p>↑ NO production (9 and 18 mGy)</p> <p>↑ Oxidative stress survival (18, 27, and 36 mGy)</p> <p>↓ Survival to oxidative stress (54, 63, and 72 mGy)</p> <p>↓ Reproduction rate (1.8 and 2.7 mGy)</p> <p>↓ Rate of apoptosis (36 mGy)</p>
<p>Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells</p> <p>Jahns et al. (2011)</p>	<p>DCs and human T cells</p>	<p>50 mGy</p>	<p>External X-ray</p>	<p>Flow cytometry, ELISA, spectrophotometry</p>	<p>↔ All parameters studied</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Assessment of Some Immune Parameters in Occupationally Exposed Nuclear Power Plant Workers: Flow Cytometry Measurements of T Lymphocyte Subpopulations and Immunoglobulin Determination</p> <p>Gyuleva IM et al. (2015)</p>	Workers at a nuclear plant	9.53, 49.24 mSv	Occupational radiation	Automated hematology analyzer, microscopy, flow cytometry, and radial immunodiffusion	<p>↘ % CD3+ T cells (9.53 and 49.24 mGy)</p> <p>↓ % CD4+62L+ T cells (9.53 and 49.24 mGy)</p> <p>↗ % CD4+62L- T cells (9.53 mGy)</p> <p>↓ % CD4+25+ T cells (9.53 mGy)</p> <p>↓ CD4+25+ T cells (9.53 mGy)</p> <p>↑ % CD4+38+ T cells (9.53 mGy)</p> <p>↗ IgA (9.53 and 49.24 mGy)</p> <p>↑ IgM (9.53 mGy)</p> <p>↗ IgM (49.24 mGy)</p>
<p>Low-dose Gamma-rays and Simulated Solar Particle Event Protons Modify Splenocyte Gene and Cytokine Expression Patterns</p> <p>Rizvi et al. (2011)</p>	C57BL/6 mice	50 mGy (chronic)	External Gamma rays	Weighing, RT-PCR, automatic hematology analyzer, and multiplex	<p>↓ Expression of Ccl11 (50 mGy)</p> <p>↑ Expression of Ccl11 (2 Gy)</p> <p>↑ Expression of Ccr5, Cd80, and Inha (50 mGy)</p> <p>↑ Expression of Cd80 (50 mGy + 2 Gy)</p> <p>↓ IL-9 expression (50 mGy + 2 Gy)</p> <p>↑ Relative weight (50 mGy, compared to 2 Gy)</p> <p>↑ IFN-gamma (50 mGy + 2 Gy, without cell activation)</p> <p>↑ MIP-1alpha, GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha and IL-13 after CD3 activation (in all groups)</p> <p>↑ RANTES after CD3 activation (2 Gy and 50 mGy + 2 Gy)</p> <p>↓ IL-9 and IL-7 after CD3 activation (50 mGy)</p> <p>↓ MIP-1alpha after PMA/I activation (50 mGy and 50 mGy + 2 Gy)</p> <p>↓ IFN-gamma and TNF-alpha after PMA/I activation (50 mGy)</p> <p>↓ IL-9 after PMA/I activation (all groups)</p>
<p>Low-Dose Total Body Irradiation Can Enhance</p>	BALB/c female mice	100 mGy (alone or before	Proton accelerator	Weighing, PET/CT scans, flow cytometry,	<p>↓ Primary tumor growth (RT and LDR + RT).</p> <p>↓ Secondary tumor growth (LDR + RT)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Systemic Immune Related Response Induced by Hypo-Fractionated Radiation</p> <p>Liu J et al. (2019)</p>		radiotherapy)	(local, right flank)	immunohistochemistry, and ELISA	<p>↓ Primary tumor growth (range between LDIR and RT of 2, 3, 4, and 5).</p> <p>↓ Secondary tumor growth (interval between LDIR and RT of 2, 3, and 4 days)</p> <p>Greater survival of mice in the 3-day interval group</p> <p>↑ Rat Survival (LDR + RT)</p> <p>↓ Dimensions and number of metastases (LDR+RT)</p> <p>↑ Cellular apoptosis in the primary tumor (RT and LDR + RT)</p> <p>↑ DNA damage (RT)</p> <p>↓ DNA damage (LDR + RT, when compared to RT)</p> <p>↑ T and B cell infiltration in the primary tumor (RT and LDR + RT)</p> <p>↑ T-cell infiltration in the secondary tumor (LDR + RT)</p> <p>↑ CD8+IFN-gamma+ T cells and CD8/CD4 ratio in secondary tumor (LDR + RT)</p> <p>↓ G-MDSC in secondary tumor (all groups)</p> <p>↑ M-MDSC in secondary tumor (LDR + RT)</p> <p>↓ M2 in the secondary tumor (LDR+RT)</p>
<p>Transcriptome Analysis Of Low-Dose Ionizing Radiation-Impacted Genes In CD4+ T-Cells Undergoing Activation and Regulation Of Their Expression Of Select Cytokines</p> <p>Cho et al. (2019)</p>	CD4+ T cells from C57BL/6N mice	0, 10, 20, and 50 mGy acutely, and 10 and 50 mGy chronically	External Gamma rays	Spectrophotometry, GO and GSEA sequencing and analysis, qRT-PCR, flow cytometry, and ELISA	<p>5056 genes with differentiated expression (50 mGy)</p> <p>↑ 205 of 3089 upregulated (related to ribosomal, mitochondrial functions)</p> <p>↓ 282 of 2417 downregulated (related to nucleotide binding)</p> <p>↑ IFN-gamma (10 and 50 mGy acute and 50 mGy chronic)</p> <p>↑ IL-4 (50 mGy acute and chronic)</p> <p>↑ IL-5 (chronic 10 and 50 mGy)</p> <p>↓ TGF-beta1 (50 mGy acute and chronic)</p> <p>↑ IL-10 (50 mGy acute)</p> <p>↓ FoxP3+ cells (50 mGy)</p> <p>↓ TGF-beta (50 mGy)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
Assessment Of Some Immune Parameters In Occupationally Exposed Nuclear Power Plants Workers: Flowcytometry Measurements Of T, B, Nk And Nkt Cells Gyuleva I et al. (2015)	Nuclear plant workers	0, 9,53, 49,52 mSv	Occupational radiation	Automated hematology analyzer	↓ % CD4+ T cells (9.53 mSv) ↑ % CD8+ T cells (9.53 mSv) ↑ % T CD57+CD8-, T CD3+CD16+CD56+ (or NKT) and T CD57+CD8+ cells (9.53 and 49.52 mSv) Analysis of reference values: ↑ Frequency of T CD8+ and NKT above normal (9.53 mSv) ↑ CD4+ T frequency and CD4+ /CD8+ ratio below normal (9.53 and 49.52 mSv)
Effect of Continuous Irradiation with a Very Low Dose of Gamma Rays on Life Span and the Immune System in SJL Mice Prone to B-Cell Lymphoma Lacoste-Collin et al. (2007)	SJL/J female mice	100 mGy per year	External Thorium nitrate	Weighing, necropsy, immunohistochemistry, and flow cytometry	↗ Increased mouse survival ↗ Incidence of lymphomas (between 38 and 44 weeks) ↑ % CD49+ NK cells (28 and 32 weeks in the spleen) ↓ % CD8+ T cells (after 32 weeks in spleen) ↗ Cytotoxicity of NK cells
Effects of Low-dose Irradiation on Enhancement of Immunity by Dendritic Cells Shigematsu et al. (2007)	Male C57BL/6 and BALB/c mice	20, 50 e 100 mGy	External Gamma rays	WST-8 exam, flow cytometry, RT-PCR, and ELISA	↑ T cell proliferation (culture with irradiated DC cells) ↔ Expression of antigens ↗ IL-10 (DC, 50 mGy) ↑ IL-2, IL-12 and IFN-gamma (DC, 50 mGy)

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Low-Dose Irradiation Differentially Impacts Macrophage Phenotype in Dependence of Fibroblast-Like Synoviocytes and Radiation Dose</p> <p>Deloch et al. (2019)</p>	<p>Fibroblast-like synoviocytes (FLS) and bone marrow macrophages from hTNF-alpha transgenic mice</p>	100 mGy	External X-ray	Flow cytometry and qRT-PCR	<p>↔ Polarization of macrophages (1st treatment)</p> <p>↓ MHC-II expression (2nd treatment)</p> <p>↘ Expression of CD86 (2nd treatment)</p>
<p>Macrophage and tumor cell responses to repetitive pulsed X-ray radiation</p> <p>Buldakov et al. (2016)</p>	Human macrophages and C57BL/6 mice	1, 10, 100 mGy	X-rays (local)	Measurement and weighing, MTT exam, ELISA, and immunofluorescence	<p>↓ Weight, size of tumors, and metastasis (100 mGy)</p> <p>↑ Polarization for M2</p> <p>↑ IL-6 and IL-1beta (100 mGy, 3 days after irradiation)</p> <p>↑ IL-6 (100 mGy, 5 days after irradiation)</p>
<p>Alteration of Cytokine Profiles in Uranium Miners Exposed to Long-Term Low Dose Ionizing Radiation</p> <p>Li K et al. (2014)</p>	Miners in a uranium mine	4 mSv/year, divided into: Accumulation <20 mGy (<5 years of work) and >20 mGy (>5 years of work)	Occupational radiation	Microarray	<p>↑ IP-10, IL-1sRI, IL-15, IL-2, GM-CSF, IL-13, TNF-beta, IL-10 and TGF-beta</p> <p>↑ IL-1alpha and IL-3</p> <p>Positive correlation with working time</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
The Effects of Low-dose Ionizing Radiation in the Activated Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3) Mast Cells Joo et al. (2012)	Basophilic leukemia mast cells from RBL-2H3 mice	10, 50, and 100 mGy (acute and chronic)	Gamma rays (externally)	MTT test, spectrophotometry, ELISA, microplate fluorometer, immunoblotting, flow cytometry, microscopy	<p>↓ Secretion of histamine and beta-hexosamine (10 mGy acute and 10 and 50 mGy chronic, after IgE activation, 1 hour later)</p> <p>↓ IL-4 (10 and 50 mGy acute, 5 hours later)</p> <p>↓ TNF-alpha (10 and 50 and 100 mGy acute, 5 hours later)</p> <p>↓ IL-4 and TNF-alpha (chronic 10 and 50 mGy, 5 hours later)</p> <p>↓ Ca²⁺ influx (10, 50, and 100 mGy, resulting from FcεRI inhibition)</p> <p>↓ Phosphorylation Lym, Syk and PKCs, and Cγ phospholipase (10 and 50, and 100 mGy)</p> <p>↓ Phosphorylation of MAPK (ERK, JNK, and p38) and release of endocytic vesicles (10 and 50 and 100 mGy)</p>
Alterations of immune functions induced by 12C6+ ion irradiation in mice Xie et al. (2007)	Kun-Ming mice	10, 50, and 75 mGy	12C6+ ion (externally)	Weighing, MTT test, ELISA	<p>↑ thymus mass (10, 50 and 75 mGy)</p> <p>↑ spleen mass (10 and 75 mGy)</p> <p>↗ spleen mass (50 mGy)</p> <p>↑ NK activity (50 mGy)</p> <p>↗ NK activity (10 and 75 mGy)</p> <p>↘ IFN-gamma (in thymus, 10 and 75 mGy)</p> <p>↗ IFN-gamma (in thymus, 50 mGy)</p> <p>↑ IFN-gamma (in serum, 50 mGy)</p>
Acute pulmonary and splenic response in an in vivo model of whole-body low-dose X-radiation exposure Puukila et al. (2019)	Male Sprague Dawley Rats	2 and 20 mGy	External X-ray	Histology, and Western blot	<p>↔ Lung activity</p> <p>↔ Protein and cellular content of bronchoalveolar lavage</p> <p>↔ cell proliferation</p> <p>↓ Splenocyte apoptosis 2 mGy (0.5h, 4h, and 24h after irradiation)</p> <p>↓ Splenocyte Apoptosis 20 mGy (0.5h)</p> <p>↑ Catalase in the lung (all doses, all time points)</p> <p>↔ Catalase and SOD in the spleen</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Differential radio-adaptive responses in BALB/c and C57BL/6 mice: pivotal role of calcium and nitric oxide signalling</p> <p>Premkumar et al. (2019)</p>	<p>BALB/c (radio sensitive) and C57BL/6 (radiore sistant) mice</p>	<p>100 mGy (alone or before radiothera py)</p>	<p>External Gamma rays</p>	<p>ELISA, flow cytometry, Western blot</p>	<p>↑ ROS (C57BL/6, 100 mGy, 24h and 48h)</p> <p>↑ RNS and Ca²⁺ (BALB/c, 100 mGy, 24h and 48h)</p> <p>↗ ROS (BALB/c, 100 mGy + 2Gy, 24h)</p> <p>↑ RNS (BALB/c, 100 mGy + 2Gy, 24h)</p> <p>↑ Ca²⁺ (BALB/c, 100 mGy + 2 Gy, compared to 2 Gy, 24 h)</p> <p>↑ ROS, RNS and Ca²⁺ (C57BL/6, 100 mGy + 2 Gy, 24h)</p> <p>↑ Phosphorylation of all MAPKs (BALB/c with stimulation, 100 mGy, 1h, 24h and 48h after irradiation)</p> <p>↑ Phosphorylation of all MAPKs (C57BL/6 without and with stimulation, 100 mGy, 1h, 24h and 48h and 72h after irradiation)</p> <p>↑ Phosphorylation of all MAPKs (C57BL/6 with stimulation, 100 mGy + 2 Gy)</p> <p>↘ Cell proliferation (BALB/c with stimulation, 100 mGy, 1h)</p> <p>↓ Cell proliferation (C57BL/6 with stimulation, 100 mGy and 100 mGy + 2Gy)</p> <p>↗ IL-2 (both mice, with and without inhibition, 100 mGy)</p> <p>↗ IL-2 (BALB/c, without inhibition, 100 mGy + 2 Gy, compared to 2 Gy)</p> <p>↘ IL-2 (BALB/c, with inhibition, 100 mGy + 2GY)</p> <p>↘ IL-2 (C57BL/6, with and without inhibition, 100 mGy + 2 Gy)</p>
<p>Increase in the Th1-Cell-Based Immune Response in Healthy Workers Exposed to Low-Dose Radiation - Immune System Status of Radiology Staff</p> <p>Karimi et al. (2017)</p>	<p>Radiology departm ent workers</p>	<p><50 mSv</p>	<p>Occupat ional radiatio n</p>	<p>Hematology analyzer, microscopy, MTT exam, ELISA</p>	<p>↔ Hematological parameters</p> <p>↑ Leukocyte proliferation</p> <p>↑ IFN-gamma</p> <p>↓ IL-4</p>
<p>Analysis of immune cell</p>	<p>C57BL/6 mice</p>	<p>1, 10, and 100 mGy,</p>	<p>Gamma rays</p>	<p>Weighing hemocytometer,</p>	<p>↘ Total splenocytes at all doses, SR and FR (day 2)</p> <p>↑ Total splenocytes 1 mGy, SR (day 7)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
Song et al. (2015)		single (SR) or fractional (FR) irradiation in 3 days	(external)	flow cytometry, hematology analyzer, qRT-PCR, and western blot	<p>↓ Neutrophils (100 mGy FR, days 2 and 7)</p> <p>↓ Neutrophils (1 and 10 mGy SR, day 2)</p> <p>↑ % Total T lymphocytes (1 and 100 mGy SR, day 2)</p> <p>↓ % total T lymphocytes (100 mGy SR and FR, day 14)</p> <p>Subpopulations of Splenocytes</p> <p>↑ % T CD4+ (1 and 100 mGy SR and 100 mGy FR, day 2)</p> <p>↓ % DC (all SR doses, day 2)</p> <p>↓ % CH (100 mGy SR and 10 mGy FR, day 7)</p> <p>↓ % DC (100 mGy FR, days 2 and 7)</p> <p>↓ % Macrophages (10 and 100 mGy SR, day 2)</p> <p>↓ % T CD8+ (10 and 100 mGy SR, day 7)</p> <p>↓ % T CD8+ (100 mGy SR, day 14)</p> <p>↓ % T CD8+ (1 mGy FR, day 7)</p> <p>↓ % T CD8+ (10 and 100 mGy FR, days 2, 7 and 14)</p> <p>↓ % CD86+ DC (all SR doses, day 2)</p> <p>↓ % DC CD86+ (100 mGy SR, day 7)</p> <p>↓ % T CD28+ (10 and 100 mGy SR, days 7 and 14)</p> <p>↓ % NK CD69+ (100 mGy, day 2 and day 14)</p> <p>Cytokine expression</p> <p>↑ IFN-gamma and IL-5 (100 mGy SR, day 2)</p> <p>↑ IL-4 (10 and 100 mGy SR, day 2)</p> <p>↑ IFN-gamma and IL-12 (all FR doses, day 2)</p> <p>↑ IL-10 (10 mGy FR, day 2)</p> <p>↓ IL-4 (100 mGy FR, day 2)</p> <p>↑ IFN-gamma and IL-12 (all SR doses, day 7)</p> <p>↓ IL-10 (1 and 10 mGy SR, day 7)</p> <p>↓ IL-4 (100 mGy SR, day 7)</p> <p>↑ IL-10 (all FR doses, day 7)</p> <p>↑ IL-4 (1 and 10 mGy FR, day 7)</p> <p>Expression of ROS-related proteins:</p> <p>↑ Nrf2 (1 mGy FR, day 2)</p> <p>↑ Nrf2 and HO-1 (1 and 10 mGy SR, day 7)</p> <p>↑ iNOS (10 mGy SR, day 2 and 7)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
					<p>↓ iNOS (1 and 100 mGy FR, day 2)</p> <p>↑ NF-kB (all FR doses, day 2)</p> <p>↑ NF-kB (all SR doses, day 7)</p>
<p>Transcriptomic profiling reveals gene expression in human peripheral blood after exposure to low dose ionizing radiation</p> <p>Fang et al. (2022)</p>	Human blood samples	50 mGy	Gamma rays	qRT-PCR, GO analysis, and analysis of protein interaction networks	<p>Gene expression analysis</p> <p>876 DEGs (50 vs 0 mGy)</p> <p>↑ 318 DEGs</p> <p>↓ 558 DEGs</p> <p>488 DEGs (50 vs 150 mGy)</p> <p>↑ 263 DEGs</p> <p>↓ 225 DEGs</p> <p>↑ Genes associated with antigen processing and presentation (50 mGy)</p> <p>↓ Genes associated with genetic diseases such as Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's... (50 mGy)</p> <p>HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB2, HLA-DRB1, and HLA-DRB5 identified as mediators of dose effects</p>
<p>Assessment of some factors of cellular and humoral immunity in radiology workers</p> <p>Ebrahimiyan et al. (2021)</p>	Radiology department workers	14.3 and 5.6 mSv accumulated (<10 years and >10 years, respectively)	Occupational radiation	Flow cytometry, biochemical analyzer	<p>↗ IgA and IgM (when comparing experimental and control groups)</p> <p>↑ CD4+/CD8+ (14.3 mSv, compared to 5.6 mSv)</p>
<p>In Vivo Irradiation of Mice Induces Activation of Dendritic Cells</p> <p>Persa et al. (2018)</p>	C57BL/6 mice	100 mGy	External X-rays	Flow cytometry, magnetic separation, and RT-PCR	<p>↔ Phenotype</p> <p>↑ IL-10</p> <p>↗ IL-1beta, IL-6, IL-12, TNF-alpha</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Low-dose Photon and Simulated Solar Particle Event Proton Effects on Foxp3+ T Regulatory Cells and Other Leukocytes</p> <p>Gridley et al. (2010)</p>	C57BL/6 mice	10 mGy, isolated (LDIR) or with a dose of 1.6 Gy (LDIR + sSPE)	External Cobalt plates	Weighing, immunohistochemistry, hematology analyzer	<p>↓ Relative spleen mass (LDIR + sSPE, compared with control and LDIR only, 0 and 4 days)</p> <p>↑ Apoptosis in skin samples (LDIR and LDIR + sSPE)</p> <p>↓ Total blood leukocytes (LDIR + sSPE, compared to control and LDIR, day 4)</p> <p>↓ Blood lymphocytes (LDIR + sSPE, compared to control and LDIR, days 4 and 21)</p> <p>↓ Total leukocytes and lymphocytes in the spleen (LDIR + sSPE, compared to control and LDIR, day 4)</p> <p>↓ Granulocytes in spleen (LDIR + sSPE, day 4)</p> <p>↓ % Lymphocytes (LDIR + sSPE, day 4 and 21, blood)</p> <p>↑ % Monocytes/macrophages and granulocytes (LDIR + sSPE, day 4 and 21, blood)</p> <p>↑ % Monocytes/Macrophages (LDIR + sSPE, day 4, spleen)</p> <p>↓ Blood B cells (LDIR + sSPE, day 4)</p> <p>↓ Blood B, T, and NK cells (LDIR + sSPE, day 21)</p> <p>↓ CD8+ T cells in the blood (LDIR + sSPE, day 4 control only and day 21 when compared to control and LDIR)</p> <p>↓ T and B cells in the spleen (LDIR and LDIR + sSPE, day 4)</p> <p>↓ Treg FoxP3+ and Treg FoxP3- cells in spleen (LDIR + sSPE, day 4)</p> <p>↑ FoxP3+CD4+ in spleen (LDIR + sSPE, day 4)</p> <p>↓ % B cells (LDIR + sSPE, day 4, blood and spleen)</p> <p>↑ % NK cells (LDIR + sSPE, day 4, blood and spleen)</p>
<p>Influence of continuous, very low-dose gamma-irradiation on the mouse immune system</p> <p>Courtade et al. (2001)</p>	C57BL/6 mice	100 mGy/year	External Thorium Nitrate	Flow cytometry, activation, and evaluation of cell proliferation and ELISA	<p>↑ Splenocytes (month 12)</p> <p>↑ Thymocytes (month 18)</p> <p>↓ IgG1 (months 12, 18, and 24)</p> <p>↓ IgG2 (months 18 and 24)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Effects of Chronic Low-Dose Internal Radiation on Immune-Stimulatory Responses in Mice</p> <p>Khan et al. (2021)</p>	<p>FVB/N-Tg(MM TVneu) 202Mul/J female mice</p>	<p>10 and 100 mGy</p>	<p>Tritium in water, HTO (internal)</p>	<p>NK and T cell proliferation test, measurement of IFN-gamma, flow cytometry and qRT-PCR</p>	<p>↑ % NK cells in the spleen, lungs, and mammary glands (8 months, 10 mGy)</p> <p>↑ % NK cells in the lungs (6 months, 10 mGy)</p> <p>↑ % NK cells in the spleen (3.5 months, 100 mGy)</p> <p>↑ % CD8+ T cells in the spleen (100 mGy, 8 months)</p> <p>↗ % CD8+ T cells in the spleen (10 mGy, 8 months)</p> <p>↑ % T cells in the lung (100 mGy, 8 months)</p> <p>↓ % Lung B cells (all doses, 6 months)</p> <p>↑ % B cells in the lung (10 mGy, 8 months)</p> <p>↗ Activation of NK cells (10 and 100 mGy, 3.5 months)</p> <p>↑ Activation of CD4+ T cells (100 mGy, 6 and 8 months)</p> <p>↑ % IFN-gamma producing NK cells (100 mGy, 3.5 months)</p> <p>↑ % Granzyme B-producing NK, CD4+ and T CD8+ cells (10 mGy, 8 months)</p> <p>↓ NK cells proliferation, CD4+, CD8+ (stimulation with IL-2, 100 mGy, 3.5 and 6 months)</p> <p>↑ CD4+ and CD8+ T cell proliferation (stimulation with IL-2 and CD3/CD28, 100 mGy, 8 months)</p> <p>↓ CD4+ T cell proliferation (stimulation by CD3/CD28, 100 mGy, 3.5 and 6 months)</p> <p>↓ CD8+ T cell proliferation (CD3/CD28 stimulation, 100 mGy, 3.5 months)</p> <p>↓ Expression of NKG2D (100 mGy, 3.5 months)</p> <p>↑ Expression of NKG2D (10 mGy, 6 months)</p> <p>↑ Expression of NKG2D (100 mGy, 8 months)</p> <p>↓ Expression of NKG2DL (10 mGy, 6 months)</p> <p>↓ Expression of NKG2DL (100 mGy, 8 months)</p> <p>↑ Rae-1 and Mult.1 (10 and 100 mGy, 3.5 months)</p>
<p>A pilot survey for circulatory diseases risk assessment in nuclear power plant workers</p>	<p>Workers at a nuclear plant</p>	<p>11.8 mSv, 53.2 mSv</p>	<p>Occupational radiation</p>	<p>Hematology analyzer and ELISA</p>	<p>↔ Lymphocyte quantification</p> <p>↑ % activated CD4+ T cells (11.8 mSv)</p> <p>↑ activated CD4+ T cells (11.8 mSv)</p> <p>↑ IL-6, CRP, and IFN-gamma</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
Gyuleva et al. (2021)					
Effect of low-dose fast neutrons on the protein components of peripheral blood mononuclear cells of whole-body irradiated Wistar rats Saeed et al. (2020)	Wistar rats	10 mGy	External Am-Be Neutrons	FTIR spectroscopy	<p>↑ Changes in protein structure (days 2 and 4 post-irradiation, total number and %)</p> <p>↑ DNA breaks (days 0, 2, and 4)</p> <p>Normalization of values on day 8</p>
Impacts of Terrestrial Ionizing Radiation on the Hematopoietic System Shahid, Chaudhry, et al. (2015)	Residents of areas with high normal radiation levels	Between 0.4383 to 1.3149 mSv/year	Natural radiation	Study of hematological parameters	<p>↓ Mean cellular hemoglobin (52% of inhabitants)</p> <p>↓ Mean cellular hemoglobin concentration (44%)</p> <p>↓ Platelets (28%)</p> <p>↑ Lymphocytes (28%)</p>
Exposure to Low to Moderate Doses of Ionizing Radiation Induces A Reduction of Pro-Inflammatory Ly6chigh Monocytes and a	Male C57BL/6 ApoE ^{-/-} mice	50 and 100 mGy, acutely or chronically	External Gamma rays	Flow cytometry and qRT-PCR	<p>↓ % pro-inflammatory monocytes (50 and 100 mGy, acute or chronic)</p> <p>↓ % effector T cells (chronic 100 mGy)</p> <p>↘ Effector T cells (chronic 50 mGy)</p>

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
U-Curved Response of T Cells in APOE -/- Mice Rey et al. (2021)					
Identification of specific gene expression after exposure to low dose ionizing radiation revealed through integrative analysis of cDNA microarray data and the interactome Son et al. (2019)	Human Skin Samples EpiDer	≤ 100 mGy	External X-ray	qRT-PCR, KEGG, GO, and protein interaction networks analysis	844 DEGs (LDIR) <ul style="list-style-type: none"> ↑ 311 DEGs ↓ 533 DEGs <ul style="list-style-type: none"> ↑ Genes associated with “cytokine/receptor interaction”, apoptosis, NOD-like receptor signaling pathway ↓ Genes associated with “complement and coagulation cascades”, “melanogenesis”, “nitrogen metabolism”, “basal cell carcinoma”, “hedgehog signaling pathway” and “cancer pathways” ↑ Antigen presentation and processing genes (LDIR) ↓ Antigen presentation and processing genes (HDIR) <p>Analysis of protein-protein interaction networks identified EP966 as a possible target molecule for LDIR exposure</p>
In vivo study of interferon-γ, transforming growth factor-β, and interleukin-4 gene expression induced by radioadaptive response. Bahreyni-Toossi, Sankian (Bahreyni-Toossi et al. 2021)	Male BALB/c mice	100 mGy isolated (LDIR) or with 2 Gy (HDIR)	External Gamma rays	Microscopy, qRT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> ↓ viable lymphocytes (all doses) ↑ Viable lymphocytes LDIR+HDIR compared to HDIR) ↓ IL-4 and TGF-beta (LDIR + HDIR) ↑ IL-4 and TGF-beta (LDIR + HDIR versus HDIR) ↗ IFN-gamma/IL-4 ratio (LDIR + HDIR) ↓ IFN-gamma/IL-4 ratio (LDIR + HDIR compared to HDIR)

Article	Model	Doses	Radiation source	Analysis methods	Relevant data
<p>Risk estimation of the low-dose fast neutrons on the molecular structure of the lipids of peripheral blood mononuclear cells</p> <p>Saeed and Abolaban (2020)</p>	<p>female Wistar rats</p>	<p>10 mGy</p>	<p>External Am-Be Neutrons</p>	<p>infrared spectroscopy</p>	<p>↑ Structural changes (days 2 and 4) ↓ Phospholipid concentration (days 2 and 4)</p>

References

- Abbas AL, Andrew; Pillai, Shiv 2019. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 6th ed. Elsevier.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 124(4):783-801.
- Amundson SD, KT; Fornace, AJ Jr. 1999. Induction of stress genes by low doses of gamma rays. *Radiat Res*.
- Antonelli F, Campa A, Esposito G, Giardullo P, Belli M, Dini V, Meschini S, Simone G, Sorrentino E, Gerardi S et al. 2015. Induction and Repair of DNA DSB as Revealed by H2AX Phosphorylation Foci in Human Fibroblasts Exposed to Low- and High-LET Radiation: Relationship with Early and Delayed Reproductive Cell Death. *Radiation Research*. 183(4):417-431.
- Artis D, Spits H. 2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 517(7534):293-301.
- Bahreyni-Toossi MT, Sankian M, Azimian H, Najafi-Amiri M, Khademi S, Abdollahi-Dehkordi S, Hamzian N. 2021. In vivo study of interferon-gamma, transforming growth factor-beta, and interleukin-4 gene expression induced by radioadaptive response. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 17(2):537-542.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2(10):907-916. eng.
- Bogdandi EN, Balogh A, Felgyinszki N, Szatmari T, Persa E, Hildebrandt G, Safrany G, Lumnitzky K. 2010. Effects of Low-Dose Radiation on the Immune System of Mice after Total-Body Irradiation. *Radiation Research*. 174(4):480-489.
- Bolus NE. 2017. Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*. 45(4):259-264.
- Boyman O, Sprent J. 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 12(3):180-190.
2017. Macrophage and tumor cell responses to repetitive pulsed X-ray radiation. 5th International Congress on Energy Fluxes and Radiation Effects (EFRE); Oct 02-07 2016; Tomsk, RUSSIA.
- Candeias SM, Mika J, Finnon P, Verbiest T, Finnon R, Brown N, Bouffler S, Polanska J, Badie C. 2017. Low-dose radiation accelerates aging of the T-cell receptor

- repertoire in CBA/Ca mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 74(23):4339-4351.
- Cargnello M, Roux PP. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 75(1):50-83. eng.
- Cervelli T, Panetta D, Navarra T, Andreassi MG, Basta G, Galli A, Salvadori P, Picano E, Del Turco S. 2014. Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 235:510-518.
- Cho SJ, Kang H, Hong EH, Kim JY, Nam SY. 2019. Transcriptome analysis of low-dose ionizing radiation-impacted genes in CD4(+) T-cells undergoing activation and regulation of their expression of select cytokines. *Journal of Immunotoxicology*. 15(1):137-146.
- Courtade M, Caratero A, Jozan S, Pipy B, Caratero C. 2001. Influence of continuous, very low-dose gamma-irradiation on the mouse immune system. *International Journal of Radiation Biology*. 77(5):587-592.
- Cuadrado A, Nebreda AR. 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 429(3):403-417. eng.
- Deloch L, Fuchs J, Ruckert M, Fietkau R, Frey B, Gaipf US. 2019. Low-Dose Irradiation Differentially Impacts Macrophage Phenotype in Dependence of Fibroblast-Like Synoviocytes and Radiation Dose. *Journal of Immunology Research*. 2019.
- Ebrahimiyan S, Montazerabadi A, Masoumi H, Keshtkar M. 2021. Assessment of some factors of cellular and humoral immunity in radiology workers. *Radiation and Environmental Biophysics*. 60(3):501-505.
- El-Saghire H, Michaux A, Thierens H, Baatout S. 2013. Low doses of ionizing radiation induce immune-stimulatory responses in isolated human primary monocytes. *International Journal of Molecular Medicine*. 32(6):1407-1414.
- Fang F, Yu XL, Wang XC, Zhu XJ, Liu LT, Rong L, Niu DS, Li J. 2022. Transcriptomic profiling reveals gene expression in human peripheral blood after exposure to low-dose ionizing radiation. *Journal of Radiation Research*. 63(1):8-18.
- Gao H, Dong Z, Gong XK, Dong JC, Zhang YY, Wei W, Wang R, Jin SZ. 2018. Effects of various radiation doses on induced T-helper cell differentiation and related cytokine secretion. *Journal of Radiation Research*. 59(4):395-403.

- Gridley DS, Xian LO, Rizvi A, Makinde AY, Pecaut MJ, Mao XW, Slater JM. 2010. Low-dose Photon and Simulated Solar Particle Event Proton Effects on Foxp3(+) T Regulatory Cells and Other Leukocytes. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 9(6):637-649.
- Gyuleva I, Djounova J, Rupova I. 2021. A pilot survey for circulatory diseases risk assessment in nuclear power plant workers. *International Journal of Radiation Research*. 19(3):583-590.
- Gyuleva I, Panova D, Djounova J, Rupova I. 2015. Assessment Of Some Immune Parameters In Occupationally Exposed Nuclear Power Plants Workers: Flowcytometry Measurements Of T, B, Nk And Nkt Cells. *Dose-Response*. 13(1).
- Gyuleva IM, Penkova KI, Rupova IT, Panova DY, Djounova JN. 2015. Assessment of Some Immune Parameters in Occupationally Exposed Nuclear Power Plant Workers: Flow Cytometry Measurements of T Lymphocyte Subpopulations and Immunoglobulin Determination. *Dose-Response*. 13(4).
- Haber AH, Rothstein BE. 1969. Radiosensitivity and Rate of Cell Division: "Law of Bergonie and Tribondeau". *Science*. 163(3873):1338-1339.
- Heeb LEM, Egholm C, Boyman O. 2020. Evolution and function of interleukin-4 receptor signaling in adaptive immunity and neutrophils. *Genes & Immunity*. 21(3):143-149.
- Howell EK, Gaschak SP, Griffith KDW, Rodgers BE. 2011. The Effects Of Environmental Low-Dose Irradiation On Tolerance To Chemotherapeutic Agents. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(3):640-649.
- Ivashkiv LB. 2018. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 18(9):545-558.
- Iyer SS, Cheng G. 2012. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 32(1):23-63. eng.
- Jahns J, Anderegg U, Saalbach A, Rosin B, Patties I, Glasow A, Kamprad M, Scholz M, Hildebrandt G. 2011. Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 709-10:32-39.

- Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. 2021. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 22(5). eng.
- Joo HM, Nam SY, Yang KH, Kim CS, Jin YW, Kim JY. 2012. The Effects of Low-dose Ionizing Radiation in the Activated Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3) Mast Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 287(33):27789-27795.
- Joshi GS, Joiner MC, Tucker JD. 2014. Cytogenetic characterization of low-dose hyper-radiosensitivity in Cobalt-60 irradiated human lymphoblastoid cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 770:69-78.
- Karimi G, Balali-Mood M, Alamdaran SA, Badie-Bostan H, Mohammadi E, Ghorani-Azam A, Sadeghi M, Riahi-Zanjani B. 2017. Increase in the Th1-Cell-Based Immune Response in Healthy Workers Exposed to Low-Dose Radiation - Immune System Status of Radiology Staff. *Journal of Pharmacopuncture.* 20(2):107-111.
- Kesaniemi J, Jernfors T, Lavrinienko A, Kivisaari K, Kiljunen M, Mappes T, Watts PC. 2019. Exposure to environmental radionuclides is associated with altered metabolic and immunity pathways in a wild rodent. *Molecular Ecology.* 28(20):4620-4635.
- Khan AU, Blimkie M, Yang DS, Serran M, Pack T, Wu J, Kang JY, Laakso H, Lee SH, Le Y. 2021. Effects of Chronic Low-Dose Internal Radiation on Immune-Stimulatory Responses in Mice. *International Journal of Molecular Sciences.* 22(14).
- Kordon AO, Pinchuk L, Karsi A. 2022. Adaptive Immune System in Fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 22(4).
- Lacoste-Collin L, Jozan S, Cances-Lauwers V, Pipy B, Gasset G, Caratero C, Courtade-Saidi M. 2007. Effect of continuous irradiation with a very low dose of gamma rays on life span and the immune system in SJL mice prone to B-cell lymphoma. *Radiation Research.* 168(6):725-732.
- Lacoste-Collin L, Jozan S, Pereda V, Courtade-Saidi M. 2015. Influence Of A Continuous Very Low Dose Of Gamma-Rays On Cell Proliferation, Apoptosis And Oxidative Stress. *Dose-Response.* 13(1).
- Li HH, Wang YW, Chen RX, Zhou B, Ashwell JD, Fornace AJ. 2015. Ionizing Radiation Impairs T Cell Activation by Affecting Metabolic Reprogramming. *International Journal of Biological Sciences.* 11(7):726-736.

- Li K, Chen YS, Li XL, Lei SJ, Chen QF, Liu JX, Sun QF. 2014. Alteration of Cytokine Profiles in Uranium Miners Exposed to Long-Term Low Dose Ionizing Radiation. *Scientific World Journal*.
- Liang-Hao D, Masato S, Fanqing C, Jeng-Jong H, Sandeep B, Clarissa L, Jan-Fang C, David JC. 2005. Gene Expression Profiles of Normal Human Fibroblasts after Exposure to Ionizing Radiation: A Comparative Study of Low and High Doses. *Radiation Research*. 164(1):17-26.
- Liu J, Cao S, Kim S, Chung EY, Homma Y, Guan X, Jimenez V, Ma X. 2005. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr Immunol Rev*. 1(2):119-137. eng.
- Liu J, Zhou J, Wu M, Hu CF, Yang J, Li D, Wu P, Chen Y, Chen P, Lin S et al. 2019. Low-Dose Total Body Irradiation Can Enhance Systemic Immune Related Response Induced by Hypo-Fractionated Radiation. *Frontiers in Immunology*. 10.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2(1):17023.
- Meloche S, Pouysségur J. 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 26(22):3227-3239. eng.
- Morris RM, Mortimer TO, O'Neill KL. 2022. Cytokines: Can Cancer Get the Message? *Cancers*. 14(9):2178.
- Nobel Lectures in Physics. 1998. World Scientific Publishing Company.
- Nowosielska EM, Cheda A, Zdanowski R, Lewicki S, Scott BR, Janiak MK. 2018. Effect of internal contamination with tritiated water on the neoplastic colonies in the lungs, innate anti-tumour reactions, cytokine profile, and haematopoietic system in radioresistant and radiosensitive mice. *Radiation and Environmental Biophysics*. 57(3):251-264.
- Park HS, You GE, Yang KH, Kim JY, An S, Song JY, Lee SJ, Lim YK, Nam SY. 2015. Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells. *European Journal of Cell Biology*. 94(12):653-660.
- Persa E, Szatmari T, Safrany G, Lumniczky K. 2018. In Vivo Irradiation of Mice Induces Activation of Dendritic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(8).

- Premkumar K, Nair J, Shankar BS. 2019. Differential radio-adaptive responses in BALB/c and C57BL/6 mice: pivotal role of calcium and nitric oxide signalling. *International Journal of Radiation Biology*. 95(6):655-666.
- Prud'homme GJ. 2007. Pathobiology of transforming growth factor β in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Laboratory Investigation*. 87(11):1077-1091.
- Puukila S, Muise S, McEvoy J, Bouchier T, Hooker AM, Boreham DR, Khaper N, Dixon DL. 2019. Acute pulmonary and splenic response in an in vivo model of whole-body low-dose X-radiation exposure. *International Journal of Radiation Biology*. 95(8):1072-1084.
- Rauta PR, Nayak B, Das S. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms [Review]. *Immunol Lett*. 148(1):23-33. English.
- Reed AB. 2011. The history of radiation use in medicine. *Journal of Vascular Surgery*. 53(1):3S-5S.
- Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students. 2003. Podgorsak EB, editor. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency
- Rey N, Ebrahimian T, Gloaguen C, Kereselidze D, Magneron V, Bontemps CA, Demarquay C, Olsson G, Haghdoust S, Lehoux S et al. 2021. Exposure to Low to Moderate Doses of Ionizing Radiation Induces A Reduction of Pro-Inflammatory Ly6chigh Monocytes and a U-Curved Response of T Cells in APOE -/- Mice. *Dose-Response*. 19(2).
- Rizvi A, Pecaut MJ, Gridley DS. 2011. Low-dose Gamma-rays and Simulated Solar Particle Event Protons Modify Splenocyte Gene and Cytokine Expression Patterns. *Journal of Radiation Research*. 52(6):701-711.
- Rock KL, Lai J-J, Kono H. 2011. Innate and adaptive immune responses to cell death. *Immunological Reviews*. 243(1):191-205.
- Rothkamm K, Löbrich M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(9):5057-5062.
- Saeed A, Abolaban F. 2020. Risk estimation of the low-dose fast neutrons on the molecular structure of the lipids of peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 533(4):1048-1053.

- Saeed A, Murshed MN, Al-Shahari EA. 2020. Effect of low-dose fast neutrons on the protein components of peripheral blood mononuclear cells of whole-body irradiated Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 27(32):40443-40455.
- Shahid S, Chaudhry MN, Mahmood N, Sheikh S. 2015. Impacts of Terrestrial Ionizing Radiation on the Hematopoietic System. *Polish Journal of Environmental Studies*. 24(4):1783-1794.
- Shahid S, Mahmood N, Chaudhry MN, Ahmad N. 2015. Mutations of the human interferon alpha-2b (hIFN alpha-2b) gene in low-dose natural terrestrial ionizing radiation exposed dwellers. *Cytokine*. 76(2):294-302.
- Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, Zhang Y, Zhang L, Yuan ZR, Tan HS et al. 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res*. 16(2):126-133. eng.
- Shigematsu A, Adachi Y, Koike-Kiriyama N, Suzuki Y, Iwasaki M, Koike Y, Nakano K, Mukaide H, Imamura M, Ikehara S. 2007. Effects of low-dose irradiation on enhancement of immunity by dendritic cells. *Journal of Radiation Research*. 48(1):51-55.
- Son JC, Jeong HO, Lee EK, No SG, Park D, Chung HY. 2019. Identification of specific gene expression after exposure to low dose ionizing radiation revealed through integrative analysis of cDNA microarray data and the interactome. *International Journal of Radiation Research*. 17(1):15-23.
- Song KH, Jung SY, Kho SH, Hwang SG, Ha H, Nam SY, Song JY. 2017. Effects of low-dose irradiation on mice with Escherichia coli-induced sepsis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 333:17-25.
- Song KH, Kim MH, Kang SM, Jung SY, Ahn J, Woo HJ, Nam SY, Hwang SG, Ryu SY, Song JY. 2015. Analysis of immune cell populations and cytokine profiles in murine splenocytes exposed to whole-body low-dose irradiation. *International Journal of Radiation Biology*. 91(10):795-803.
- Spiering MJ. 2015. Primer on the Immune System. *Alcohol Res*. 37(2):171-175. eng.
- Szatmari T, Kis D, Bogdandi EN, Benedek A, Bright S, Bowler D, Persa E, Kis E, Balogh A, Naszalyi LN et al. 2017. Extracellular Vesicles Mediate Radiation-Induced Systemic Bystander Signals in the Bone Marrow and Spleen. *Frontiers in Immunology*. 8.

- Takatsu K, Moon B-g, Itakura A, Tsukamoto Y, Horikawa K, Ikutani M, Kouro T, Takaki S. 2005. Role of IL-5 in the innate immune system and disease control. *International Congress Series*. 1285:145-154.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 6(10):a016295. eng.
- Tau G, Rothman P. 1999. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy*. 54(12):1233-1251. eng.
- Tewari S, Husain N, Rastogi M, Mishra S, Srivastava AK, Khan K. 2016. Peripheral Blood Lymphocytes as In Vitro Model to Evaluate Genomic Instability Caused by Low Dose Radiation. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. Volume 17:1773-1777.
- Volkova PY, Bondarenko EV, Kazakova EA. 2022. Radiation hormesis in plants. *Current Opinion in Toxicology*. 30.
- Wilson KD, Sun N, Huang M, Zhang WY, Lee AS, Li Z, Wang SX, Wu JC. 2010. Effects of Ionizing Radiation on Self-Renewal and Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells. *Cancer Research*. 70(13):5539-5548.
- Xie Y, Zhang H, Wang YL, Zhou QM, Qiu R, Yuan ZG, Zhou GM. 2007. Alterations of immune functions induced by 12C6-ion irradiation in mice. *International Journal of Radiation Biology*. 83(9):577-581.
- You K, Gu H, Yuan Z, Xu X. 2021. Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling and Organogenesis [Mini Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9. English.
- Zakeri F, Hirobe T, Noghabi KA. 2010. Biological effects of low-dose ionizing radiation exposure on interventional cardiologists. *Occupational Medicine-Oxford*. 60(6):464-469.
- Zhou L, Zhang XY, Li H, Niu C, Yu DH, Yang GZ, Liang XY, Wen X, Li M, Cui JW. 2018. Validating the pivotal role of the immune system in low-dose radiation-induced tumor inhibition in Lewis lung cancer-bearing mice. *Cancer Medicine*. 7(4):1338-1348.



ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE



I Jornadas do CISA: Jovens com a Ciência

Low Dose Ionizing Radiation (LDIR) and the immune system: a review

Ricardo Martins¹, Ricardo Ferraz², Pedro Costa³

¹- CISA, ESS, Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4249-015 Porto, Portugal, 1021013@ess.uppt.pt

²- LAQV-REQUIMTE, FCUP, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal & Área Técnica Científica das Ciências Químicas e das Biomoleculares Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4249-015 Porto, Portugal, rferraz@ess.uppt.pt

³- Área Técnica Científica de Medicina Nuclear CISA, ESS, Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4249-015 Porto, Portugal, psc@ess.uppt.pt

Introduction

Ionizing radiation (IR) is unavoidable in medicine, whether it is in cancer treatment, through radiotherapy with high doses, or in imaging with low doses. While the effects of high dose ionizing radiation (HDIR) are well known, low dose effects are still shrouded in controversy. IR will act on cells either directly, altering DNA and protein structure, or through the creation of free radicals, affecting a cell's functionality and ultimately, viability [1]. This will affect the immune system (IS), as IR not only induces an immune response, but also targets immune cells, which according to the law of Bergonie and Tribondeau are radiosensitive. While not consensual, it is theorized that IR might have an hormesis effect [2]. LDIR has been defined in 2012 as any dose lower than 100 mGy. Despite this, multiple articles have different definitions of LDIR, and as a result, knowledge about the effects might be somewhat skewed.

In this article, we've collected information from multiple articles and attempted to describe how LDIR might interact with the immune system, with only LDIR-related data.

Methods

First, we've used the Web of Science search engine to demonstrate the difference between IR-IS vs LDIR-IS studies. Then, for literature analysis, out of 100 relevant articles found using the same method for LDIR-IS articles, a second screen was made, using the following inclusion criteria:

- experimental articles, not reviews;
- major focus on "IS-LDIR" that don't deviate too much from such topic;
- at least one set of results related to a radiation dose ≤ 100 mGy, that is clear and easily distinguishable from results provided by other doses of irradiation;

The remaining articles were analysed, their data compiled and presented below.

Results

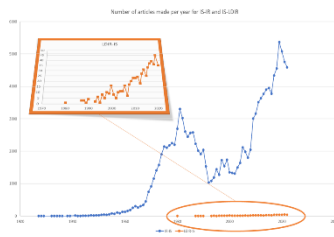


Figure 1 – Comparison of the number of articles made per year for IS-IR and IS-LDIR, data found on Web of Science™ databases, orange is LDIR-IS

Out of 100 papers, 55 were excluded. The reasons for exclusion were:

- Lowest dose of radiation used > 100 mGy – 34
- Doesn't fit the theme – 10
- Somewhat fits the theme, not completely – 4
- No distinction between LDIR and its effects – 1
- Can't collect data on LDIR effects – 2
- Article not available – 3
- Not an actual article – 1

Figure 2 – Summary of the data divided into 3 groups: cytokines, cells and others. Data presented is expressed in number of instances of change.

Cytokines	Increased			Decreased		
	acute LDIR	chronic LDIR	Total	acute LDIR	chronic LDIR	Total
IFN-gamma	16	10	26	4	1	5
GM-CSF	6	3	9	0	0	0
IL-10	3	5	8	6	1	7
IL-2	6	2	8	0	0	0
IL-5	6	2	8	0	0	0
IL-6	5	2	7	0	0	0
IL-12	4	3	7	0	0	0
IL-4	3	4	7	10	4	14
TNF-alpha	2	4	6	4	6	10
TGF-beta	0	0	0	6	0	6

Cells	Increased			Decreased		
	acute LDIR	chronic LDIR	Total	acute LDIR	chronic LDIR	Total
NK cells (%)	3	5	8	0	0	0
T CD8+ cells (%)	2	2	4	10	8	18
Lymphocytes (%)	2	3	5	6	0	6
Monocytes (%)	5	0	5	0	0	0
T CD4+ cells (%)	3	1	4	5	1	6
Dendritic cells (%)	0	0	0	7	3	10
Splenicocytes (%)	0	0	0	7	0	7
B cells (%)	0	0	0	4	2	6

Other	Increased			Decreased		
	acute LDIR	chronic LDIR	Total	acute LDIR	chronic LDIR	Total
MMP2 phosphorylation	12	0	12	0	0	0
NO production	12	0	12	0	0	0
NF-kB expression	3	3	6	0	0	0
NF2 expression	4	1	5	0	0	0
NK cytotoxicity	5	0	5	0	0	0
Primary tumour growth	0	0	0	8	0	8
Splenic cell apoptosis	0	0	0	5	0	5
Secondary tumour growth	0	0	0	4	0	4
Egr1 expression	0	0	0	4	0	4
SO2 expression	0	0	0	4	0	4

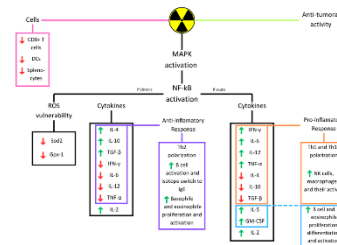


Figure 2- Summary of key findings of this review.

Conclusion

Irradiation with LDIR will result in cell activation through MAPK and NF-kB pathways, which will induce immune cell proliferation, activation, polarization and cytokine production.

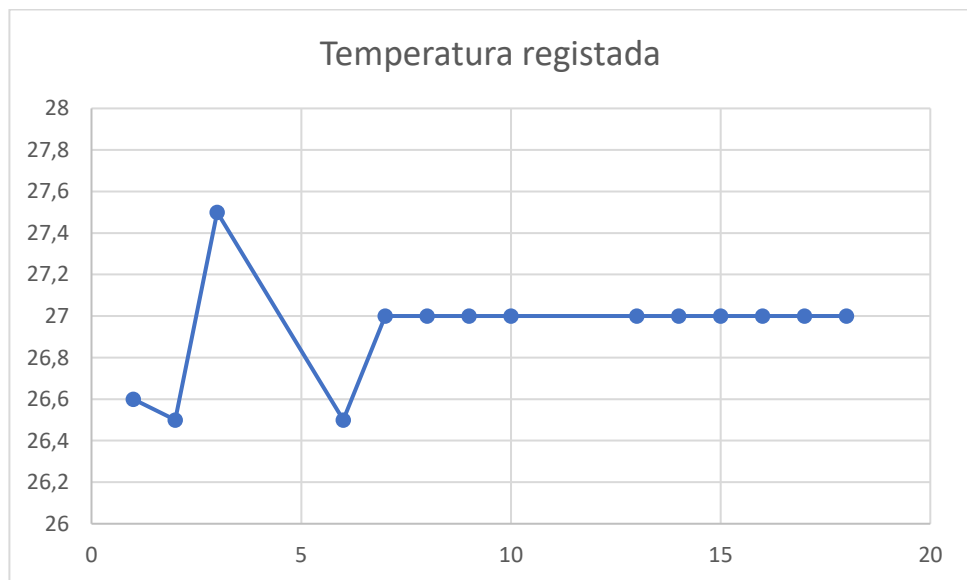
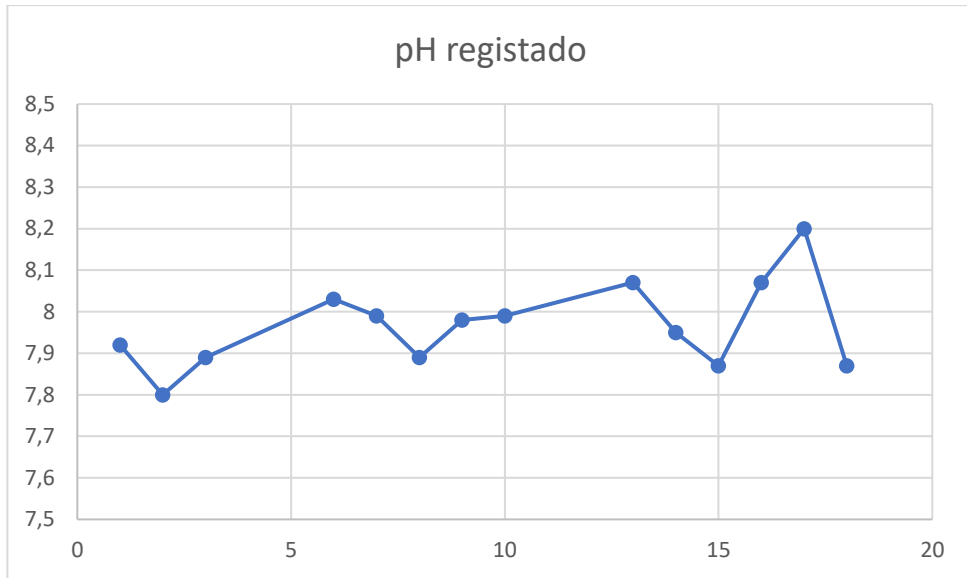
Acute LDIR will induce pro-inflammatory responses, but will also have a negative impact in cell counts, with splenicocytes, CD8+ T cells and DCs being the main targets. It also seems to induce adaptive reactions and when combined with radiotherapy, seems to have anti-tumoral activity.

Chronic LDIR will do the opposite, leading to an anti-inflammatory response, but also leaving the organism vulnerable to ROS damages.

1- Rothkamm, K., & Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5061-5062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0893018100>

2. Bolus, N. F. (2007). Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 43(4), 259-264. <https://doi.org/10.2967/jnm.117.195230>

Anexo 3- Parâmetros medidos durante a manutenção dos peixes zebra



Anexo 4- Registos feitos durante o sacrificio

Grupo	Massa de peixe inteiro (mg)	Tamanho (cm)	Massa de material biológico (mg)	Sexo
Controlo Grupo 1	139	2,2	27,4	F
	104	2,3	11,9	F
	252	2,8	38,3	M
	142	2,3	16,0	M
	91	2,1	20,1	F
	171	2,1	26,8	F
	246	3,0	32,8	M
	134	2,5	17,0	F
	126	2,2	18,1	M
	138	2,4	33,2	M
Grupo 1	262	2,9	41,0	M
	273	2,8	28,4	F
	71	1,8	9,7	F
	83	2,1	18,8	F
	108	2,3	11,3	F
	197	2,7	28,1	F
	80	2,1	10,1	F
	120	2,3	20,6	F
	158	2,6	17,8	F
	103	2,1	21,2	F
Controlo Grupo 2	240	2,6	39,1	M
	91	2,2	14,2	F
	154	2,5	28,9	M
	Peixes perdidos			
	172	2,6	21,5	M
	212	2,9	13,6	F
	161	2,7	15,8	M
	161	2,6	20,5	M
141	2,5	17,4	M	
Grupo 2	117	2,2	28,4	M
	144	2,6	14,0	F
	159	2,5	17,6	F
	202	2,8	23,6	F
	183	2,6	18,2	F
	101	2,2	9,9	F
	279	3,0	21,9	F
	152	2,6	7,0	F
	229	2,5	27,1	M
	194	2,2	18,1	F

Controlo Grupo 3	141	2,5	12,9	F
	219	2,8	31,2	M
	212	2,6	26,1	M
	263	3,0	28,9	F
	98	2,4	11,9	F
	180	2,6	14,8	F
	187	2,9	15,2	F
	100	2,1	11,0	M
	85	2,0	7,9	F
	79	2,1	7,7	F
Grupo 3	120	2,5	15,9	F
	162	2,5	14,1	F
	140	2,6	13,1	F
	111	2,3	6,7	F
	226	2,9	21,1	M
	174	2,5	15,9	M
	141	2,5	26,8	F
	197	2,5	18,5	F
	185	2,5	12,6	F
	347	3,3	23,5	F
Controlo Grupo 4	211	2,6	29,5	M
	141	2,5	14,9	F
	74	2,0	9,6	M
	123	2,4	14,4	F
	201	2,9	10,8	F
	121	2,5	10,0	F
	190	2,5	22,0	M
	189	2,6	12,5	F
	306	3,0	33,4	M
	137	2,5	12,8	F
Grupo 4	168	2,6	9,0	F
	115	2,4	10,1	F
	255	2,7	17,9	F
	101	2,3	12,0	M
	135	2,4	12,7	F
	168	2,8	10,0	F
	115	2,4	10,1	F
	192	2,6	19,4	F
	164	2,6	12,9	F
	181	2,8	14,0	F
Média	163,38	2,5077	18,451	